Versuche zur Erklärung der intestinalen Toxizität einiger nicht-steroidaler Antiphlogistika

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Klaus Dietzel
aus Schwarzenbach/Saale

1989

UNIV. LEIDEN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538124_0017

VERSUCHE ZUR ERKLÄRUNG DER INTESTINALEN TOXIZITÄT EINIGER NICHT-STEROIDALER ANTIPHLOGISTIKA

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

Klaus Dietzel

aus Schwarzenbach/Saale

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.1987

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof.Dr. G. Nollau

Erstberichterstatter: Prof.Dr. E. Nürnberg

Zweitberichterstatter: Prof.Dr. K. Brune

Für Friederike

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Nach dem Gesetz über die Einheiten im Meßwesen vom 2.7.1969, geändert am 6.7.1973, ist die offizielle Einheit für Temperaturangaben Kelvin (K). Zum besseren Verständnis wird stattdessen im Text die Einheit Celsius (C) verwendet.

Als "Intestinum" bezeichnet man laut ROCHE Lexikon Medizin (Urban & Schwarzenberg, 1984) den gesamten Darm. Im folgenden werden der Einfachheit halber die Begriffe "Dünndarm" (bestehend aus Duodenum, Jejunum und Ileum) und "Intestinum" synonym verwendet.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen oder Warenbezeichnungen berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Warenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG - PROBLEMSTELLUNG	1
2.	MATERIALIEN UND METHODEN	13
2.1.	Materialien, Referenzsubstanzen, Pufferlösungen	13
2.1.1.	Untersuchungen zur Polymorphie von IBU-S-AS	14
2.1.1.1.	Röntgendiffraktometrie	15
2.1.1.2.	Differentialthermoanalyse	16
2.1.1.3.	Thermogravimetrie	18
2.1.2.	Physiko-chemische Eigenschaften von IBU-S-AS	19
2.1.2.1.	Verteilungskoeffizient	19
2.1.2.2.	pH-Löslichkeitsprofil	19
2.2.	Untersuchungen zur Pharmakodynamik	22
2.2.1.	Wirkung auf die Prostaglandinfreisetzung aus Mausperitonealmakrophagen	22
2.2.2.	Wirkung beim Carrageenin-induzierten Rattenpfotenödem	26
2.2.3	Gastrointestinale Toxizität bei der Ratte	28
2.3.	Untersuchungen zur Pharmakokinetik	31
2.3.1.	Analysenmethoden	31
2.3.1.1.	Geräte, HPLC Bedingungen	31
2.3.1.2.	Analyse von Ibuprofen und seiner Metaboliten in biologischen Materialien	34
2.3.1.3.	Analyse von Indometacin und seiner Metaboliten in biologischen Materialien	40
2.3.1.4.	Analyse von IBU-S-AS in biologischen Materialien	45

2.3.1.5. Analyse der Gesamtgallensäuren 46

2.3.2. Untersuchungen an der Ratte 48
2.3.2.1. Elimintion und enterohepatische Rezirkulation 48

2.3.3. Untersuchungen zur biliären Elimination bei weiteren Spezies 52
2.3.3.1. Elimination und enterohepatische Rezirkulation am Hund 52
2.3.3.2. Biliäre und renale Elimination am Patienten 54

2.3.4. Statistische und pharmakokinetische Auswertung 58

3. ERGEBNISSE 59

3.1. Ergebnisse der pharmakodynamischen Untersuchungen 59
3.1.1. Wirkung auf die Prostaglandinfreisetzung aus Mausperitonealmakrophagen 59
3.1.2. Wirkung beim Carrageenin-induzierten Rattenpfotenödem 62
3.1.3 Gastrointestinale Toxizität bei der Ratte 66

3.2. Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen 71

3.2.1. Untersuchungen an der Ratte 71
3.2.1.1. Elimination und enterohepatische Rezirkulation von
3.2.1.1.1. Ibuprofen 71
3.2.1.1.2. Indometacin 79
3.2.1.1.3. IBU-5-AS 86

3.2.2	Untersuchungen an weiteren Spezies	87
3.2.2.1.	Elimination und enterohepatische Rezirkulation am Hund von	
3.2.2.1.1.	Ibuprofen	87
3.2.2.1.2.	Indometacin	90
3.2.2.2.	Biliäre und renale Elimination am Patienten von	
3.2.2.2.1.	Ibuprofen	94
3.2.2.2.2.	Indometacin	96
4.	DISKUSSION	97
5.	ZUSAMMENFASSUNG	129
6.	ANHANG	133
7.	LITERATUR	155
	Danksagung	167
	Lebenslauf	168

1. EINLEITUNG

Unter "Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises" oder kurz "Rheuma" fasst man allgemein alle Krankheitsbilder zusammen, welche mit Schmerzen und/oder Funktionseinschränkungen des Bewegungsapparates einhergehen.

Man kann zwischen entzündlichen und degenerativen Krankheiten der Gelenke und der Wirbelsäule sowie weichteilrheumatischen Erkrankungen unterscheiden. Bei den entzündlichen Erscheinungsbildern handelt es sich wahrscheinlich in erster Linie um immunologisch bedingte Ereignisse. Bei den degenerativen Formen dominieren Abnützungserscheinungen des Gelenkknorpels bzw. der Bandscheiben der Wirbelsäule, während weichteilrheumatische Erkrankungen vor allem durch überbeanspruchung der Muskulatur und des Sehnenapparates provoziert werden können.

Die Bedeutung rheumatischer Erkrankungen geht eindrucksvoll aus Informationen der Schweizerischen Rheumaliga hervor (67). Demgemäß liegt die Ursache von 14-20 % aller krankheitsbedingten Arbeitsausfälle und 15-25 % aller Invaliditätsfälle in der Schweiz in Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises begründet.
Da es bisher in den meisten Fällen nicht gelingt, die Ursachen direkt zu beseitigen, bleibt nur die Möglichkeit der Linderung der Beschwerden. Dazu stehen vor allem die nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAID = non-steroidal anti-inflammatory drugs) zur Verfügung (23,32). Weiterhin können physikalische Methoden wie Krankengymnastik, Wärme- oder Kälteanwendung, Massagen etc. sowie sog. Basistherapeutika wie Goldsalze, D-Penicillamin, Chloroquin oder in schweren Fällen Immunsuppressiva angewendet werden. Bei akuten entzündlichen Schüben leisten Glukokortikoide wertvolle Dienste.

Die Vertreter der ersten Gruppe gehören weltweit zu den am häufigsten verwendeten Pharmaka. Sie wirken vor allem analgetisch, antiphlogistisch und antipyretisch. Der derzeit akzeptierte Wirkungsmechanismus dieser Pharmaka besteht in der Hemmung der Aktivität der Cyclooxygenase (129,130). Dieses Enzym bewirkt die Bildung der sog. Prostaglandine aus Arachidonsäure der Zellmembranen. Diese ubiquitär vorkommenden "Gewebshormone" spielen bei zahlreichen physiologischen Prozessen - u.a. auch beim Entzündungsprozeß - eine wichtige Rolle (99).

Neben der Hemmung der Prostaglandinsynthese spielt nach BRUNE (22,23,24,28,31) das Verteilungsmuster im Organismus, d.h. die Pharmakokinetik, eine wesentliche Rolle für die erwünschten aber auch für die unerwünschten Effekte der sauren NSAIDs. Autoradiographische Untersuchungen ergaben, daß besonders hohe Substanzkonzentrationen am Wirkort (entzündetes Gewebe) und auch am Manifestationsort unerwünschter Wirkungen (Blut, Knochenmark, Magenwand, Leber, Niere) auftreten (siehe unten).

Wie epidemiologische Studien belegen, dominieren im Nebenwirkungsspektrum der NSAIDs Irritationen des Gastrointestinaltraktes wie Übelkeit, Erbrechen, Magen- Darmblutungen bis zu Ulzerationen und Perforationen (35, 36,79, 121,135). Weitere unerwünschte Wirkungen betreffen ZNS, Niere, Blutbild, Knochenmark, Leber und Haut (40,44,106).

Während die seit fast 100 Jahren in der Therapie eingesetzte Acetylsalicylsäure durch gastrale Nebenwirkungen auffällt (93), entwickeln die Substanzen der neueren Generation ihre toxischen Effekte vor allem im unteren Gastrointestinaltrakt (76,134). Die Ursache für diese Verlagerung des Manifestationsortes ist wahrscheinlich darin zu suchen, daß die jüngeren Vertreter der Gruppe wesentlich lipophiler sind und deswegen zu einem wesent-

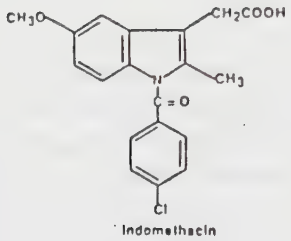
lich geringeren Prozentsatz im Magen zur Resorption gelangen (27).

WALT et al. (134) konnten zeigen, daß von 1958-1962 in England und Wales bei alten Menschen die Inzidenz von Todesfällen aufgrund gastraler Ulzerationen permanent abnahm, wohingegen gleichzeitig die Zahl der auf perforierende Duodenalulzera zurückführbaren Todesfälle anstieg. Die gleiche Arbeitsgruppe fand außerdem eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Ulzerationen und Perforationen des unteren Gastrointestinaltraktes und der Einnahme von nicht-steroidalen Antiphlogistika (77).

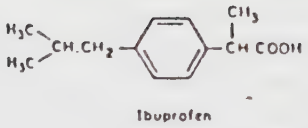
Der Grund für das gehäufte Auftreten von Dünndarmläsionen kann darin liegen, daß viele moderne NSAID einem enterohepatischen Kreislauf unterliegen, also nach Konjugation in der Leber mit der Galle in den Dünndarm gelangen und dort nach Spaltung der Konjugate wiederholt resorbiert werden. Die mehrmalige Passage der intestinalen Mukosa kann ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung der Läsionen sein (27,96,97).

Diese Hypothese wird durch Untersuchungen verschiedener Autoren gestärkt, die intestinale Nebenwirkungen auch nach parenteraler Applikation beobachteten. Für einige NSAIDs wurde bereits ein enterohepatischer Kreislauf unabhängig vom Applikationsweg beschrieben (49,51, 80,87).

Indometacin und Ibuprofen sind strukturell (Abb.1.1.) und pharmakologisch typische Vertreter der sauren nicht-steroidalen Antirheumatika. Beide Substanzen sind seit mehr als 20 Jahren in die Therapie rheumatischer Erkrankungen eingeführt.



Indomethacin



Ibuprofen

Abb.1.1. Strukturformeln von Indometacin und Ibuprofen

Die schmerz- und entzündungshemmenden Eigenschaften konnten in zahlreichen Tiermodellen nachgewiesen werden, u.a. beim Pfotenödem und der Adjuvansarthritis der Ratte und im Writhing Test an der Maus (2,58,115). Für beide Substanzen wurde in verschiedenen in vitro Modellen eine Hemmung der Cyclooxygenase (17,58,115) und der Plättchenaggregation (58) gezeigt.
Beide Substanzen zeigen die für die Wirkstoffklasse charakteristischen bereits oben erwähnten unerwünschten Wirkungen.

a) Indometacin:

Indometacin (1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-indol-3-essigsäure) ist eine chemisch stabile, weiße, kristalline Substanz mit einem Molekulargewicht von 357.8 und einem Schmelzpunkt von 155-156 °C (115,138). Die organische Säure (pK_a = 4.6) (65) löst sich in den meisten

organischen Lösungsmitteln gut, in Wasser jedoch relativ schlecht. Durch Erhöhung des pH-Wertes läßt sich die Solubilität durch Salzbildung deutlich verbessern. Die Stabilität der Substanz in wässriger Lösung nimmt jedoch deutlich ab (Halbwertszeit 1-1.5 Stunden bei pH 10 und Raumtemperatur) (115).

Die chemische Darstellung erfolgt in mehreren Schritten ausgehend von 4-Methoxy-phenylhydrazin, Lävulinsäure und 4-Chloro-benzoylchlorid über eine Fischer Indolsynthese und eine N-Acylierung (115).

Nach oraler Applikation wird die Substanz gut resorbiert und folgt im Organismus dem typischen Verteilungsmuster der Substanzklasse (33). Besonders hohe Konzentrationen werden bei Ratten im Magen-Darm-Trakt, in der Niere, in der Leber und in der Lunge erreicht (68). In Bezug auf die Plasmaproteinbindung beim Menschen nimmt Indometacin mit 90-93 % in der Reihe der NSAIDs eine Sonderstellung ein (68).

Gemäß HUCKER et al. (68) und YESAIR et al. (142) variert die Plasmaeliminationshalbwertszeit von Spezies zu Spezies beträchtlich und hängt zudem von der Applikationsart ab. Nach i.v. Injektion liegt sie zwischen 20 Minuten beim Hund und 4 Stunden bei der Ratte, nach oraler Gabe zwischen 90 Minuten beim Hund und 4 Stunden bei der Ratte. Nach ALVAN et al. (6) und KWAN et al. (75) eliminiert der Mensch Indometacin mit einer intra- und interindividuell stark schwankenden terminalen Halbwertszeit von 1-16 Stunden.

Die im Molekül enthaltenen Strukturelemente Carbonsäure, Phenolether und Säureamid sind die Angriffspunkte für die Biotransformation (50,115), die in drei Schritten nach- und nebeneinander ablaufen kann (Abb.1.2.).

- Esterglukuronidbildung an der COOH-Gruppe
- O-Demethylierung mit nachfolgender Konjugation (und zusätzlicher Esterglukuronid Bildung) und
- N-Deacylierung (und zusätzlich O-Demethylierung und Esterglukuronid Bildung).

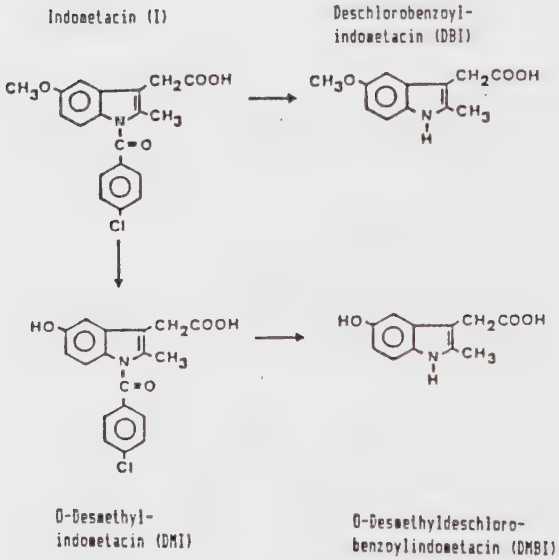


Abb.1.2. Metabolisierungsmuster von Indometacin.

HUCKER et al. (68) beschrieben einen enterohepatischen Kreislauf beim Hund. Ein Großteil der Dosis (40-70 %) gelangt nach Glukuronidierung in der Leber mit der Galle ins Duodenum und wird nach Spaltung erneut resorbiert. YESAIR et al. (142) und DUGGAN et al. (49) untersuchten

das unterschiedliche Ausmaß der Rezirkulation bei verschiedenen Spezies und stellten eine Korrelation zur Sensitivität für intestinale Läsionen fest.
Nach DUGGAN et al. (50) kommt dem enterohepatischen Kreislauf beim Menschen keine große Bedeutung zu, während ALVAN et al. (6) vermuten, daß die interindividuell stark variierende terminale Plasmaeliminationshalbwertszeit durch unterschiedlich stark ausgeprägte Rezirkulation zustande kommen könnte.

b) Ibuprofen

Ibuprofen (2-(4 -Isobutyl-phenyl)-propionsäure) stellt sich als weißes, kristallines, geruchloses Pulver mit einem Schmelzpunkt von 75-77 °C (2) und einem Molekulargewicht von 206 dar. Die organische Säure (pka = 4.6) (30) ist in den meisten organischen Lösungsmitteln gut, in Wasser wenig löslich. Zugabe von Lauge erhöht die Solubilität in wässrigen Medien aufgrund einer Salzbildung der COOH-Gruppe.
Bei fachgerechter Lagerung ist die Substanz chemisch stabil und optisch inaktiv; sie liegt als Racemat vor.

Die chemische Darstellung von Ibuprofen erfolgt in mehreren Schritten ausgehend von Isobutylbenzol, Acetylchlorid und Methyljodid (84).

Nach oraler Gabe wird Ibuprofen rasch und vollständig resorbiert. Besonders hohe Konzentrationen werden bei der Ratte 17 Stunden nach der letzten Dosis in der Schild-

drüse, den Nebennieren, den Ovarien und im Fettgewebe, beim Hund in der Galle gefunden (1,2). Die Plasmaproteinbindung beträgt bei der Ratte 96 %, bei Hund und Mensch 99 % (89).

Ibuprofen wird von Mensch und Tier hauptsächlich renal nach vorausgegangener hepatischer Metabolisierung eliminiert (89,132). Die beiden pharmakologisch inaktiven (1) Hauptmetaboliten 2-(4 - (2-Hydroxy-2-methylpropyl)-phenyl)-propionsäure und 2-(4 - (2-Carboxypropyl)-phenyl)-propionsäure (Abb.1.3.) finden sich in unterschiedlichem Ausmaß hauptsächlich konjugiert mit Glukuronsäure, Sulfat und anderen nicht näher spezifizierten Bindungspartnern im Harn von Kaninchen, Ratte, Hund, Pavian und Mensch (2,89). Daneben treten in Spuren

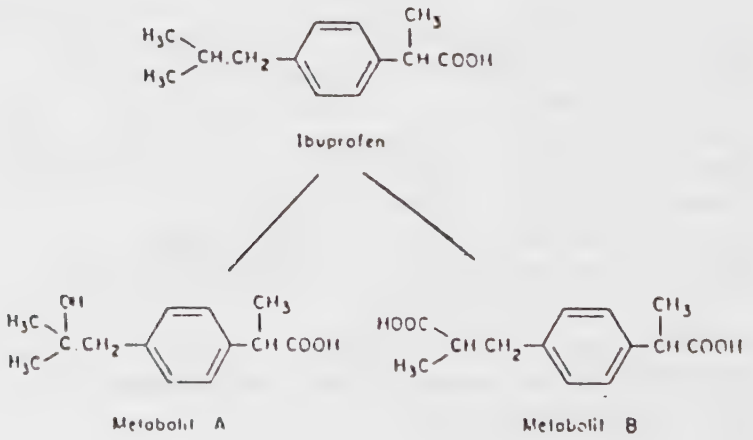


Abb.1.3. Metabolismus von Ibuprofen

(beim Menschen < 1 % der Dosis im Urin) zwei weitere Biotransformationsprodukte - 2-(4 -(2-Hydroxy-methyl-propyl)- phenyl)-propionsäure und 2-(4 - (1-Hydroxy-2-methyl-propyl)- phenyl)-propionsäure - auf.

Die Plasmaeliminationshalbwertszeit beträgt bei der Ratte ca. 50 Minuten, beim Hund 2-3 Stunden und beim Menschen zwischen 1.8 und 3 Stunden (71,120,132).

Bei Hund und Ratte gibt es Hinweise auf einen enterohepatischen Kreislauf; für den Menschen sind bisher keine Daten verfügbar (89).
Bei Applikation des Racemates findet bei der Körperpassage eine Inversion statt; die im Harn auftretenden Metaboliten sind rechtsdrehend (88).

Zur Verringerung der gastrointestinalen Toxizität nichtsteroidaler Antirheumatika wurden Vorformen (=Prodrugs) der wirksamen Säuren entwickelt, aus denen die wirksame Komponente erst nach der Resorption freigesetzt wird oder erst durch Biotransformation entsteht. Beispiele hierfür sind mit Acemetacin als Prodrug für Indometacin und Sulindac bzw. Fenbufen, aus denen das wirksame Sulfid bzw. die wirksame Biphenylessigsäure erst im Laufe des Metabolismus entstehen, verwirklicht (26,36,53).

Eine chemische Modifizierung von Diclofenac durch Säureamidbildung mit 5-Amino-salicylsäure (NB 431) wurde von MÖLLER synthetisiert und pharmakologisch charakterisiert (90,91). Der Bindungspartner 5-Aminosalicylsäure ist zur Therapie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen im Handel. Der Einsatz bei rheumatischen Erkrankungen wird diskutiert. Nach MÖLLER (90) bewirkt NB431 in vitro eine im Bereich anderer NSAIDs liegende Hemmung der Freisetzung

von Prostaglandinen aus Mausperitonealmakrophagen, sowie in vivo einen therapeutischen Effekt beim Pfotenödem und der Adjuvans- Arthritis der Ratte.
Im Hinblick auf die gastrointestinale Toxizität erwies sich NB 431 verträglicher als Diclofenac.

In Analogie wurde das Säureamid aus Ibuprofen und 5-Aminosalicylsäure (Abb.1.4.) synthetisiert.

Bei der 5- (2-(4-isobutyl-phenyl)-propionylamino-)-salicylsäure handelt es sich um eine weiße, kristalline Substanz mit einem Molekulargewicht von 341 und einem Schmelpunkt von 238-240 °C (91).

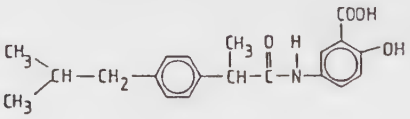


Abb.1.4. Struktur von IBU-5-AS

PROBLEMSTELLUNG:

Gegenstand dieser Arbeit war es, zwei seit langem in der Therapie rheumatischer Erkrankungen eingesetzte Wirkstoffe - Ibuprofen und Indometacin - hinsichtlich ihrer gastrointestinalen Nebenwirkungspotenz zu vergleichen. In diese Untersuchungen sollte ein neues nichtsteroidales Antirheumatikum (im folgenden als IBU-5-AS bezeichnet) einbezogen werden.

Dazu sollten zunächst invitro sowie invivo Daten der Literatur bezüglich der pharmakodynamischen Wirkungen in zu diesem Zweck etablierten Standardversuchsanordnungen überprüft, gegebenenfalls ergänzt und im Falle des IBU-S-AS im Vergleich zur Muttersubstanz Ibuprofen erhoben werden.

Ein Review der durchgeführten Studien zur Evaluierung der gastrointestinalen Toxizität von Indometacin wurde von SHEN und WINTER (115) durchgeführt.
Die beträchtlichen Differenzen der Angaben der Autoren (18, 115) lassen sich wahrscheinlich auf unterschiedliche Beurteilungskriterien sowie die Verwendung verschiedener Rattenstämme zurückführen.
Das Ausmaß der Indometacin induzierten gastrointestinalen Läsionen konnte reduziert werden durch (18,48,115)

- die gleichzeitige p.o. Applikation von Neomycin, Polymycin B oder Bacitracin
- eine fettfreie Diät
- eine balaststoffarme Diät
- Futterentzug
- Ligation des Gallenganges

Toxikologische Studien von ADAMS et al. (1) zeigten, daß Ibuprofen bei Hund und Ratte gastrointestinale Schäden verursacht, die beim Hund wesentlich ausgeprägter auftreten. Als mögliche Ursache für den Sensitivitätsunterschied dieser Spezies werden signifikant höhere Plasmaspiegel beim Hund diskutiert. Der toxische Wirkung hinsichtlich des Gastrointestinaltraktes ist gemäß (58) bei der Ratte nach oraler Gabe schwerwiegender als nach i.v. Applikation.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die unterschiedliche Potenz der Substanzen zur

Ausbildung gastrointestinaler Schäden bei verschiedenen Spezies (Ratte, Hund, Mensch) auf Unterschiede im pharmakokinetischen Verhalten zurückgeführt werden kann. Wir vermuten, daß neben einer systemischen Wirkung auf die Prostaglandinsynthese der direkte Kontakt der nichtsteroidalen Antiphlogistika mit der Mukosa des Magens bzw. des Darmes eine wesentliche Rolle spielt (96,97).

Da normalerweise nur der gelöste, undissoziierte Anteil einer Substanz Membranen passieren kann, liegt die Hypothese nahe, daß das Ausmaß der gastralen Toxizität mit der Löslichkeit bei den im Magen herrschenden pH-Bedingungen korreliert.

Der Kontakt einer Substanz mit der Darmschleimhaut ist umso intensiver, je öfter sie einem enterohepatischen Kreislauf unterliegt, d.h. nach Metabolisierung in der Leber via Galle in den Darm transportiert und dort nach Spaltung der Konjugate erneut resorbiert wird.

Demzufolge sollte weiterhin untersucht werden, welcher Anteil der applizierten Dosis der Arzneistoffe Ibuprofen und Indometacin bei Ratte, Hund und Mensch biliär eliminiert wird, welche Fraktion gegebenenfalls erneut zur Resorption gelangen kann und ob eine Korrelation mit den verursachten Dünndarmschädigungen besteht.

Für die experimentelle Substanz IBU-5-AS sollten erste orientierende Untersuchungen zur biliären Elimination an der Ratte durchgeführt werden um einen Vergleich mit den beiden klassischen Verbindungen zu ermöglichen.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Materialien, Referenzsubstanzen, Pufferlösungen

a) Allgemeine Angaben:

Alle Substanzen bzw. Lösungsmittel wiesen HPLC bzw. p.a. Qualität auf. Unter "Wasser" wird im folgenden immer Aqua bidest. verstanden. Das Wasser zur Herstellung von Fließmitteln für die HPLC war filtriert (ø 0.45 um). Die mobilen Phasen wurden vor Gebrauch im Ultraschallbad (Sonorex RK 100 Transistor, Fa. Wandelin Electronic KG, Berlin) entgast.

b) Referenz und Versuchssubstanzen:

Ibuprofen, Indometacin und Indol-3-propionsäure (als interner Standard für die Indometacinmetaboliten DBI und DMBI) wurden von der Fa. Sigma, Taufkirchen bezogen.

Die Indometacin Metaboliten wurden von der Fa. MSD, (Rahway, N.J., USA) zur Verfügung gestellt.

Die Ibuprofen Metaboliten waren eine freundliche Gabe der Fa. Kanoldt (Höchstädt/Donau).

Die internen Standards Flurbiprofen (Ch.Bez. 150571) und Fenoprofen (Lot-Nr. 98410 AE) wurden von den Firmen Dr. Karl Thomae GmbH (Biberach/Riß) bzw. Eli Lilly (Gießen) zur Verfügung gestellt.

Die experimentelle Substanz IBU-5-AS wurde gemäß (91) synthetisiert.

Pufferlösungen:

0.03 M Phosphatpuffer pH 7.5: KH_2PO_4 (MG 136.1) 0.852 g/l
$Na_2HPO_4 \times 10\ H_2O$ (MG 358.1)
8.505 g/l

0.1 M Citratpuffer pH 5.0 : Citronensäure (MG 192.1)
19.2g/l, mit 5N NaOH auf
pH 5.0 einstellen.

2.1.1. Untersuchungen zur Polymorphie von IBU-S-AS

Definitionsgemäß versteht man unter Polymorphie das Auftreten von unterschiedlichen Kristallstrukturen eines chemisch definierten Stoffes. Die Kenntnis dieses Phänomens, das für die pharmazeutische Qualität von Arzneiformen große Bedeutung besitzen kann (34,125), ist auch für den Pharmakologen wichtig, da wesentliche Unterschiede bezüglich der Bioverfügbarkeit zwischen unterschiedlichen Modifikationen bestehen können (z.B. bei Chloramphenicolpalmitat).

Da bisher keinerlei Angaben über die Kristallstruktur von IBU-S-AS verfügbar waren, erschien es notwendig, die Substanz dahingehend zu charakterisieren.

Folgende Methoden kamen zum Einsatz:

- Röntgendiffraktometrie (RD)
- Differential-Thermoanalyse (DTA)
- Thermogravimetrie (TG)

2.1.1.1. Röntgendiffraktometrie (Geräte und Analysenbedingungen siehe Anhang)

Die Röntgenbeugungsanalyse (Röntgendiffraktometrie) ist bekanntermaßen eine geeignete Methode zur Erkennung polymorpher Zustände (70). Untersucht werden bevorzugt Pulver, da die Untersuchung von Einkristallen unter galenischen Aspekten - z.B. kristallographische Untersuchung von galenischen Darreichungsformen - nicht relevant ist.
Mit Hilfe eines Pulverdiffraktometers der Fa. Philips wurde eine Probe der Substanz untersucht.

IBU-5-AS zeigt einen rein kristallinen Charakter. Das Ergebnis der pulverdiffraktometrischen Untersuchung ist in Abb. 2.1. dargestellt.

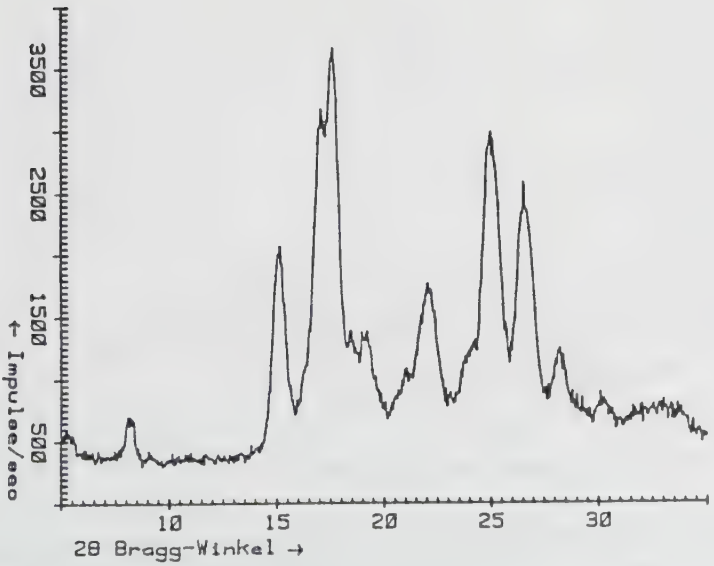


Abb. 2.1. Pulver-Röntgendiffraktogramm von IBU-5-AS

2.1.1.2. Differentialthermoanalyse (Geräte und Analysenbedingungen siehe Anhang)

Mit Hilfe der Differentialthermoanalyse (10, 113) ist es möglich, polymorphe Zustände zu identifizieren und deren Umwandlungstemperaturen bzw. Energieumsätze zu ermitteln. Unter Einbeziehung der Röntgendiffraktometrie und der Thermogravimetrie gelingt es, zwischen tatsächlicher Polymorphie und durch Solvat- bzw. Hydratbildung hervorgerufener Pseudopolymorphie zu unterscheiden.
In Abb. 2.2. ist die DTA-Kurve von IBU-5-AS dargestellt.

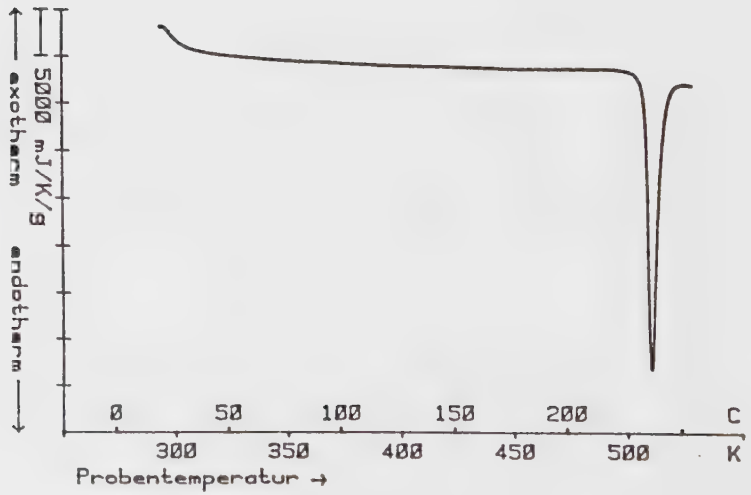


Abb. 2.2. DTA - Kurve von IBU-5-AS

Das Diagramm weist außer einem endothermen Schmelzpeak bei 337 °C keine weiteren Auslenkungen auf. Dieser Befund spricht für die Reinheit der Substanz. Die jenseits des

Schmelzpunktes andeutungsweise erkennbare endotherme Drift des DTA Signales kann als Hinweis auf eine, für Salicylsäurederivate typische, Sublimationsneigung der Substanz gedeutet werden.

In Abb. 2.3. ist die Abkühlkurve und das DTA-Signal bei einem 2. Aufheizen dargestellt. Beim Abkühlen der Schmelze tritt kein exothermes Rekristallisationssignal auf. Die 2. Aufheizkurve zeigt, daß beim Erhitzen von IBU-5-AS bis jenseits des Schmelzpunktes eine vollständige Zersetzung eingetreten sein muß. Es wurde nur eine geringfügige Auslenkung bei etwa 50 °C registriert. Beim Schmelzpunkt von 237 °C ist keine Auslenkung erkennbar.

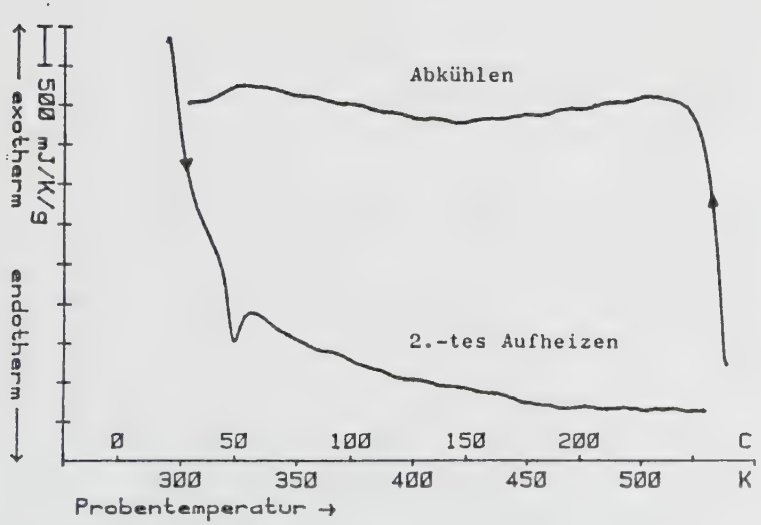


Abb. 2.3. DTA - Abkühlkurve und 2. Aufheizkurve von IBU-5-AS

2.1.1.3. Thermogravimetrie (Geräte und Analysenbedingungen siehe Anhang)

Die Thermogravimetrie ermöglicht, alle Veränderungen einer Substanz, die in Abhängigkeit von der Temperatur durch eine Zu- bzw. Abnahme der Masse gekennzeichnet sind, quantitativ zu erfassen.
In Abb. 2.4. ist die Masseveränderung von IBU-5-AS bei steigender Temperatur dargestellt. Bei ca. 230 °C tritt eine starke Abnahme der Masse ein, wahrscheinlich aufgrund Sublimations- und Zersetzungsvorgängen.

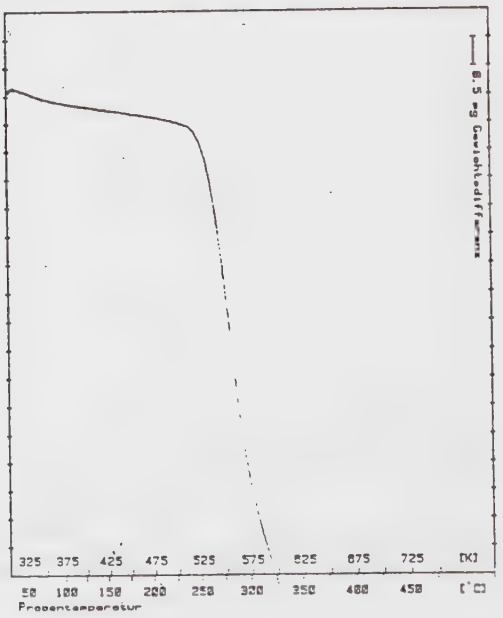


Abb. 2.4. Thermogravimetrie von IBU-5-AS

2.1.2. Physiko-chemische Eigenschaften von IBU-S-AS

Die Resorbierbarkeit und wahrscheinlich auch die gastrale Toxizität eines Stoffes hängen wesentlich von dessen Löslichkeit und dem Grad der Ionisation ab, da nur die gelöste undissozierte Fraktion in der Lage ist, lipophile Membranen zu passieren. Zur Charakterisierung von IBU-S-AS hinsichtlich dieser Aspekte war die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten zwischen n-Octanol und Phosphatpuffer pH 7.4, des pK_a-Wertes sowie des pH-Wert abhängigen Löslichkeitsprofils in Wasser erforderlich.

2.1.2.1. Bestimmung des Verteilungskoeffizienten

5 ml einer Lösung von 100 mcg/ml IBU-S-AS in isotonischem Phosphatpuffer pH 7.4 wurden in einem Schraubreagenzglas mit dem gleichen Volumen n-Octanol (E.Merck, Darmstadt) 30 Minuten geschüttelt. Nach Zentrifugation (15 Min., 2000 g) wurden die Phasen separiert und mittels HPLC (Bedingungen siehe 2.3.1.4.) auf ihren Gehalt an IBU-S-AS analysiert.

$$\text{Verteilungskoeffizient } (V_k) = \frac{\text{Konz. (mcg/ml) Octanol}}{\text{Konz. (mcg/ml) Puffer}}$$

Als Verteilungskoeffizient ermittelten wir 40.0 ± 1.52 (n=3).

2.1.1.2. pH-Löslichkeitsprofil, pK_a-Wert

Zur Ermittlung der pH-Wert abhängigen Löslichkeit einer Substanz in Wasser muß bei definierten pH-Bedingungen die jeweils in Lösung befindliche Menge quantifiziert werden.

Zur Bestimmung der Sättigungslöslichkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert wurde IBU-S-AS in einem Schraubreagenzglas in destilliertem Wasser suspendiert und mit 0.1 N NaOH bzw. 0.1 N HCl auf höhere bzw. niedrigere pH-Werte gebracht. Zur Einstellung des Gleichgewichts wurde 10 Stunden bei Raumtemperatur (22±1 °C) geschüttelt.
Nach Bestimmung des pH-Wertes (pH-Meter 530, Fa. WTW, Weilheim i. OB) wurde durch ein Filter (Porenweite 0.22 um) filtriert und die Konzentation im Filtrat mittels HPLC (siehe Kap. 2.3.1.4.) ermittelt.

Abb.2.5. zeigt in semilogarithmischer Darstellung das errechnete pH-Löslichkeitsprofil (Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie, Universität Erlangen- Nürnberg) bei Zugrundelegung einer Basallöslichkeit von 0.42 mg/100 ml und eines pK_a-Wertes von 4.50 (experimentell ermittelt).

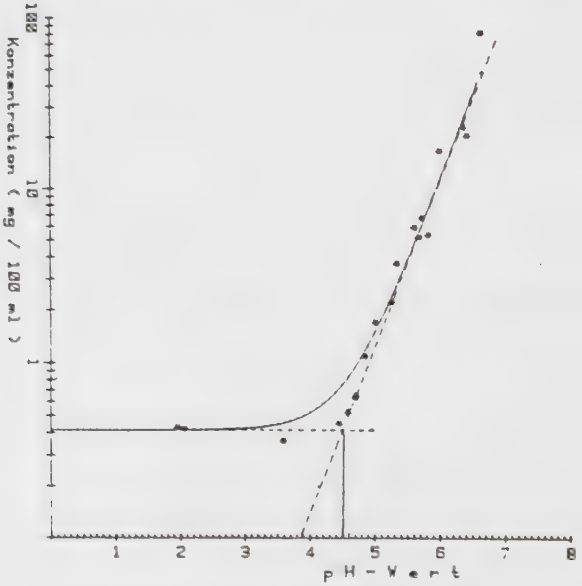


Abb. 2.5. pH - Löslichkeitsprofil von IBU-S-AS
(--- berechnet, * experimentell ermittelt)

In Tabelle 2.1. sind die für die pharmakologischen Überlegungen (siehe Kap. 4.Diskussion) relevanten physikochemischen Parameter der Wirkstoffe zusammengefaßt.

Tab. 2.1. Physikochemische Parameter von IBU-S-AS, Ibuprofen und Indometacin

Substanz	pk_a-Wert	Löslichkeit (mg/100ml) bei			
		pH 2	pH 4	pH 5	pH 6
IBU-S-AS*)	4.5	0.4	0.5	1.5	10.8
Ibuprofen**)	4.5	2.2	2.9	12.0	53.0
Indometacin**)	4.6	0.3	< 0.9	0.9	12.0

*) Eigene Ergebnisse
**) aus Lit. (30),(65), (115)

Die von OECHSLEIN (98) für Diflunisal (pK_a 3.3) beschriebene Viskositätszunahme und das massive Kristallwachstum der suspendierten Substanz bei höheren pH-Werten als 6.0 aufgrund einer Komplexbildung von 2 Diflunisalmolekülen mit einem Na^+-Ion als Koordinationszentrum wurde im untersuchten pH-Bereich nicht beobachtet. Es ist jedoch durchaus denkbar, daß wegen der geringeren Acidität von IBU-S-AS (pk_a 4.5) ein ähnliches Phänomen bei höheren pH-Werten auftreten kann.

2.2. Untersuchungen zur Pharmakodynamik

2.2.1. Wirkung auf die Prostaglandinfreisetzung aus Mausperitonealmakrophagen

Die in vitro Hemmung der Freisetzung von Prostaglandinen ist als Screeningmodell für NSAIDs weit verbreitet (16,54, 129,130). Die angewandte Methode geht auf Arbeiten von BRUNE und GLATT (25, 29, 21, 59) zurück.

Tiere: NMRI - Mäuse (Institut für Pharmakologie und Toxikologie Universität Erlangen - Nürnberg), Gewicht ca. 25 g. Die Tiere wurden in Plastikkäfigen mit Weichholzgranulat als Einstreu bei 25 °C gehalten.

a) Materialien:

(5,6,8,11,12,14,15(n) -^{3}H) Prostaglandin E_2 stammte von der Fa. Amersham International plc, England. Antiprostaglandin E_2 stellte freundlicherweise Herr Prof. B.A. Peskar, Ruhr-Universität Bochum, zur Verfügung. Die Zellkulturmedien und Seren wurden von der Fa. Gibco, Karlsruhe bezogen.

Verwendete Abkürzungen:

DMEM:	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
NCS:	Neugeborenen-Kälberserum

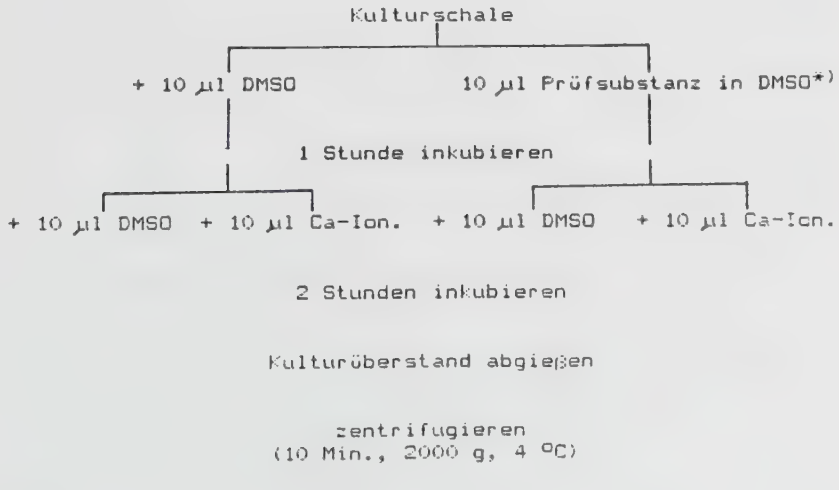
b) Gewinnung der Peritonealmakrophagen:

Die mit Etherdampf narkotisierten Mäuse wurden dekapitiert. Anschließend injizierte man 3 ml einer gekühlten, sterilen Ringerlösung in den Bauchraum, verteilte diese durch vorsichtiges Massieren und saugte die Flüssigkeit nach Eröffnung der Bauchhöhle ab.
Die Zellsuspension wurde mit gekühlter Ringerlösung auf eine Zelldichte von 10^7 Zellen/ml Lösung eingestellt.

c) Kultivierung der Makrophagen:

Pro Zellkulturschale wurden 2 x 10^6 Zellen mit 2 ml serumhaltigem (10%) DMEM über Nacht inkubiert (37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO_2). Am nächsten Tag wurden die nicht am Boden haftenden Zellen weggewaschen und 2 ml serumfreies DMEM zugesetzt.

d) Stimmulation der Makrophagen:



DMSO: Dimethylsulfoxid

Ca-Ion.: Ca-Ionophor A 23187 (Fa. Sigma, Taufkirchen)
2×10^{-4} M in DMSO

*) Geprüfte Konzentrationen:

Indometacin: 10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7} Mol/l
Ibuprofen: 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5} Mol/l
IBU-5-AS: 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4} Mol/l
5-AS: 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}, 3×10^{-3} Mol/l

e) Bestimmung der PG E_2 Konzentration im Kulturüberstandmittels eines spezifischen Radioimmunoassays (RIA) nach (90)

Zur Bestimmung der Prostaglandin E_2-Konzentration im Kulturschalenüberstand wurden folgende Proben vorbereitet:

I. Standards: 0.01 ml serumfreies DMEM
+ 0.80 ml PBS* mit 0.1 % Gelatine
+ 0.10 ml (^{3}H)-Prostaglandin E_2 (10 nCi)
+ 0.10 ml Anti-Prostaglandin E_2
+ 0.01 ml Standard mit definierten Mengen (0-10 ng) PG E_2 in PBS*

II. Proben: 0.01 ml Zellkulturüberstand
+ 0.80 ml PBS* o.1 % Gelatine
+ 0.10 ml (^{3}H)-Prostaglandin E_2 (10 nCi)
+ 0.10 ml Anti-Prostaglandin E_2

III. Leerwert**):0.01 ml serumfreies DMEM
+ 0.90 ml PBS* mit 0.1 % Gelatine
+ 0.10 ml (^{3}H)-Prostaglandin E_2 (10 nCi)

*) PBS = phosphate buffered saline
**) Markiertes Antigen, das auch durch Kohlebehandlung nicht entfernt wird

Nach 4-stündigem Stehen im Eisbad wurde zu den Ansätzen 0.1 ml 3% ige Aktivkohlsuspension in PBS (Norit-SX-1) zupipettiert, gemischt und anschließend zentrifugiert (10min, 2000xg, 4°C). Der Überstand wurde in mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllte Vials (Zinsser Mini 2000) gefüllt, anschließend gut gemischt und die Radioaktivität mit einem Flüssigszintillationszähler (Beckmann LS 9000) gemessen.

Auswertung:

Zur Ermittlung der prozentualen Hemmung der Prostaglandinfreisetzung durch die Wirkstoffe wurden die absoluten Mengen des in jeweils gleichbehandelten Kulturschalen nachweisbaren Prostaglandins E_2 bestimmt, Mittelwert und Standardabweichung errechnet und zu den Mittelwerten der Lösungsmittelkontrolle (=100 % Hemmung) sowie der mit A 23187 maximal stimulierten Proben (=0% Hemmung) in Relation gesetzt.
Aus diesen Werten wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve erstellt und daraus die IC_{50} (Inhibition concentration 50 %) graphisch ermittelt.

2.2.2. Wirkung beim Carrageenin-induzierten Rattenpfotenödem

Zur Charakterisierung der antiphlogistischen Wirksamkeit einer Substanz kann unter anderem der Effekt beim (durch ein irritierendes Agens ausgelösten) Rattenpfotenödem herangezogen werden (11,69,92,99,105,139).
Der Verlauf der Schwellung läßt sich durch die Messung des Pfotenvolumens zeitlich verfolgen und quantitativ erfassen.

Verwendet wurden männliche SIV-Ratten (Fa. Savo-Ivanovas, Kisslegg/Allgäu) mit einem Gewicht von 120-140 g, denen 24 Stunden vor Versuchsbeginn bei freiem Zugang zum Wasser das Futter entzogen wurde.
Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Tiere gewogen, die rechte Hinterpfote unterhalb des Tarsalgelenks mit Fettstift markiert und das Volumen der Pfote mit Hilfe eines Volumenmeßgerätes (Plethysmometer) bestimmt (0-Wert). Das durch das Eintauchen der Pfote verdrängte Volumen einer Tensidlösung entspricht dem Volumen der Pfote.
Zur Auslösung eines ödems injizierten wir den Tieren 0.1 ml einer 1%igen Carrageeninlösung (Viscarin, Marine Colloids Devision, Springfield, USA) in 0.9 %iger NaCl-Lösung subplantar in die markierte Hinterpfote. Zur Ermittlung des ödemverlaufs wurde das Pfotenvolumen 1 Stunde (Bezugsmessung) sowie 3, 4 und 5 Stunden (Hauptmessungen) nach Injektion des ödembildners wie oben beschrieben festgestellt.

Die Tiere (6-8 pro Gruppe) erhielten die in Tyloseschleim (Tylose MH 300; 1% in 0.9 %iger NaCl-Lösung) suspendierten Substanzen intragastral entweder 4 Stunden vor (Versuchsreihe I) oder unmittelbar vor (Versuchsreihe II) ödeminduktion per Schlundsonde appliziert. Die Tiere der Kon-

trollgruppe erhielten wirkstoffreien Tyloseschleim.

Untersuchte Substanzen und Dosierungen:

	Versuchsreihe I:	Versuchsreihe II:
Indometacin:	-	5 mg/kg
Ibuprofen:	25, 50 mg/kg	50 mg/kg
IBU-S-AS:	41.3, 82.7 mg/kg	82.7 mg/kg

Auswertung:

Aus den Differenzen zwischen Hauptmessungen (3,4,5 Stunden) und Bezugsmessung (0 Stunden) wurden Mittelwert und Standardabweichung errechnet. Zur Beschreibung des Effektes der Wirksubstanz wurde die Volumenzunahme der Kontrollgruppe zu jedem Zeitpunkt gleich 100 % gesetzt und aus der Differenz zur Wirkstoffgruppe die prozentuale Hemmung des ödems ermittelt.

2.2.3. Gastrointestinale Toxizität bei der Ratte

Versuchsdurchführung:

Die Versuche wurden mit männlichen SIV-50 Ratten (Fa. Ivanovas, Kisslegg) durchgeführt. Die Tiere (150-250 g) wurden wie die Mäuse unter 2.1. beschrieben gehalten.
Sie erhielten entweder Futter und Wasser ad libitum oder wurden in einer zweiten Versuchsreihe 24 Stunden vor Substanzapplikation bei freiem Zugang zum Wasser vom Futter abgesetzt. Jede Gruppe umfaßte 5-10 Tiere. Die Substanzen wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn in einer Methylcelluloselösung (1% Tylose MH 300 in 0.9 % iger Kochsalzlösung) suspendiert und den Tieren mittels Schlundsonde intragastral appliziert (5ml/kg Körpergewicht). Die Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen Tyloseschleim ohne Arzneistoff.

Folgende Arzneistoffdosen wurden untersucht:

Indometacin:	5, 10, 16	mg/kg Körpergewicht
Ibuprofen:	25, 100, 300	mg/kg Körpergewicht
IBU-5-AS:	41.3, 496.5	mg/kg Körpergewicht

Nach 24 Stunden wurden die Tiere mit Etherdampf getötet, der Magen und der Dünndarm wurden entnommen.

Auswertung:

Der Versuch war einfach blind angelegt, d.h. der Beurteiler wußte nicht, ob es sich bei dem vorliegenden Präparat um den Magen bzw. Darm eines behandelten oder eines Kontrolltieres handelte.

a) Gastrale Toxizität:

Der Magen wurde an der großen Kurvatur geöffnet und der Inhalt mit Wasser ausgespült. Die makroskopisch sichtbaren pathologischen Veränderungen wurden gezählt, ihrem Durchmesser (mm) entsprechend durch Multiplikation mit einem Faktor (siehe Tab.2.2.) gewichtet (94) und die erhaltenen Produkte addiert. Die Summe wurde als "Ulkuszahl" bezeichnet.

Grad	Durchmesser der Läsionen	Auswertung
I	< 1 mm	Anzahl x 1
II	1-2 mm	Anzahl x 2
III	2-3 mm (bei größeren Bereichen - Mehrfachzählung)	Anzahl x 3
		Summe = "Ulkuszahl"

Tab.2.2. Schema zur Ermittlung der "Ulkuszahl"

b) Intestinale Toxizität:

Unter der Bezeichnung "Intestinum" wird im folgenden der Dünndarm (d.h. Duodenum, Jejunum und Ileum) verstanden.

Zur Evaluierung intestinaler Veränderungen wurden Nahrungsreste und Faeces aus dem Darm herausgedrückt. Auf die Eröffnung des Darms konnte verzichtet werden. Bei der Inspektion des Darmes von außen fielen ulzerierte Areale

als kleine weiß-bräunliche, runde oder ovale Bereiche meist am Mesenterialansatz auf. Diese Segmente wurden sorgfältig herausgeschnitten, gewogen und das Gewicht zum Gesamtgewicht des Dünndarmes ins Verhältnis gesetzt ("Prozent an intestinalen Ulzerationen") (123).

$$\text{Proz. intest. Ulzerationen} = \frac{\text{Gewicht d. ulzer. Areale} \times 100}{\text{Gesamtgewicht des Darmes}}$$

2.3. Untersuchungen zur Pharmakokinetik

2.3.1. Analysenmethoden

2.3.1.1. Geräte, Hochdruckflüssigkeitschromatographische Bedingungen

Die für die HPLC Bestimmungen verwendeten Geräte sowie die HPLC Parameter für die analysierten Substanzen sind aus den folgenden Auflistungen ersichtlich.

Hochdruckflüssigkeitschromatographische Bedingungen:

Pumpe:	Beckman HPLC Pumpe Modell 114 M
Probenaufgeber:	Promis (Spark Holland)
Injektionsvolumen:	50 µl
Detektor:	Beckman Modell 165 (UV) Shimadzu F - 530 (Fluoreszenz)
Integrator:	Shimadzu CR3A
Trennsäulen:	Vorsäule: Hyperchrome ^{R} NC (Material: Nucleosil ^{R} 5 µm RP 18); 20 x 4,6 mm; Hauptsäule: Hyperchrome ^{R} ECO Tube NC (Material: Nucleosil ^{R} 5 µm RP 8); 250 x 4,6 mm; (Fa. Bischoff, Leonberg, FRG)

Ibuprofen:

Fließmittel:	Methanol / Aqua bidest. 65 / 35 + 1 ml H_3PO_4 conc. /l

Flußrate:	1.6 ml/min
Detektionswellenlänge:	220 nm
Zeitkonstante:	0.5 sec
Retentionszeit:	Ibuprofen: ca. 9.4 min Flurbiprofen: ca. 8.1 min (int. Standard)

Ibuprofen - Metaboliten

Fließmittel:	Acetonitril / Aqua bidest. 27 / 73 + 1 ml H_3PO_4 / l
Flußrate:	1.5 ml / min
Detektionswellenlänge:	220 nm
Zeitkonstante:	0.5 sec
Retentionszeit:	Met A: ca. 8.9 min Met B: ca.10.7 min

Indometacin, DMI

Fließmittel:	Acetonitril / 0.03 M Phosphatpuffer pH 5 37 / 63
Flußrate:	1.5 ml / min
Detektionswellenlänge:	260 nm
Zeitkonstante:	0.5 sec
Retentionszeit:	DMI: 5.0 min Indometacin: 10.7 min Fenoprofen: 8.7 min (int. Standard)

DBI, DMBI

Fließmittel:	Acetonitril / 0.03 M Phosphatpuffer pH 5, mit H_3PO_4 auf pH 3.0 eingestellt
Flußrate:	2.0 ml/min
Detektionswellenlänge:	Excitation: 295 nm Emission : 365 nm
Zeitkonstante:	1.5 sec
Photometrischer Meßbereich:	High
Retentionszeit:	DMBI : 4.7 min DBI : 11.7 min Indol-3-propionsäure : 16.6 min (int. Standard)

IBU-5-AS

Fließmittel:	Acetonitril / Aqua bidest. 75:25 + 1 ml H_3PO_4 / l
Flußrate:	1.5 ml/min
Detektionswellenlänge:	Excitation: 265 nm Emission : 435 nm
Zeitkonstante:	1.5 sec
Photometrischer Meßbereich:	High
Retentionszeit:	IBU-5-AS : 11.7 min

Die Detektionswellenlängen wurden aus der Literatur entnommen (7,52,82,102,119) bzw. im Falle des IBU-5-AS ermittelt.
Zur Quantifizierung der biologischen Proben wurden Standardlösungen definierter Mengen der Reinsubstanzen in

Methanol hergestellt und lichtgeschützt bei ca. 5 °C aufbewahrt. Die Lösungen erwiesen sich über einen Zeitraum von 4 Wochen als stabil - beim Vergleich mit frisch hergestellten Referenzen wurde kein Konzentrationsverlust festgestellt.

Konzentrationen: Ibuprofen: 10 mcg/ml - 500 mcg/ml (n=5)
Met A : dito (n=5)
Met B : dito (n=5)
Flurbiprofen: 100 mcg/ml

Indometacin: 1 mcg/ml - 1000 mcg/ml (n=5)
DMI : dito (n=5)
DMBI : 0.1 mcg/ml - 50 mcg/ml (n=5)
DBI : dito (n=5)
Fenoprofen : 50 mcg/ml
Indol-3-propionsäure: 20 mcg/ml

IBU-5-AS : 10 mcg/ml - 1000 mcg/ml (n=5)

2.3.1.2. Analyse von Ibuprofen und seiner Metaboliten in biologischen Materialien

Zur Quantifizierung von Ibuprofen in biologischen Materialien sind in der Literatur verschiedene Methoden beschrieben. Neben radioaktiven (89), gaschromatographischen (89,131) und dünnschichtchromatographischen (89) Verfahren bedienten sich zahlreiche Arbeitsgruppen der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (4,5,7,52,61,71, 82,95,102,116,120,127). Es liegen jedoch nur zwei Arbeiten vor , die die Bestimmung der Metaboliten im Harn mittels

HPLC beschreiben (82,114). Nicht-radioaktive Methoden zur Bestimmung des Arzneistoffes in der Galle sind uns nicht bekannt.
Bei der Entwicklung einer adäquaten Methodik zur Extraktion von Ibuprofen und der zwei Hauptmetaboliten erschien es als zweckmäßig, die Bedingungen (pH-Wert, Extraktionsmittel) so zu wählen, daß in einem Arbeitsprozeß alle drei Substanzen sowie der interne Standard Flurbiprofen zu einem möglichst hohen Prozentsatz und möglichst wenig physiologische Bestandteile aus der entsprechenden Matrix separiert wurden. Natürlich mußten unter diesen Gesichtspunkten Kompromisse bezüglich der Wiederfindungsraten eingegangen werden.

Zur Ermittlung der Wiederfindungsraten wurde arzneistoffreiem Material (Plasma, Galle, Harn) definierte Mengen von Ibuprofen und der Metaboliten in Phosphatpuffer pH 7.5 zugesetzt, der entsprechenden Extraktionsprozedur unterworfen und mit nicht extrahierten Referenzlösungen verglichen.

Zur Ermittlung der Tagesschwankung wurden dieselben Proben an 5 aufeinanderfolgenden Tagen analysiert.

Die Quantifizierung unbekannter Proben erfolgte immer durch Versetzen von arzneistoffreien, vor Versuchsbeginn gewonnenen, Leerwerten mit definierten Konzentrationen der Referenzsubstanzen, die dann der entsprechenden Aufbereitungprozedur unterworfen wurden.

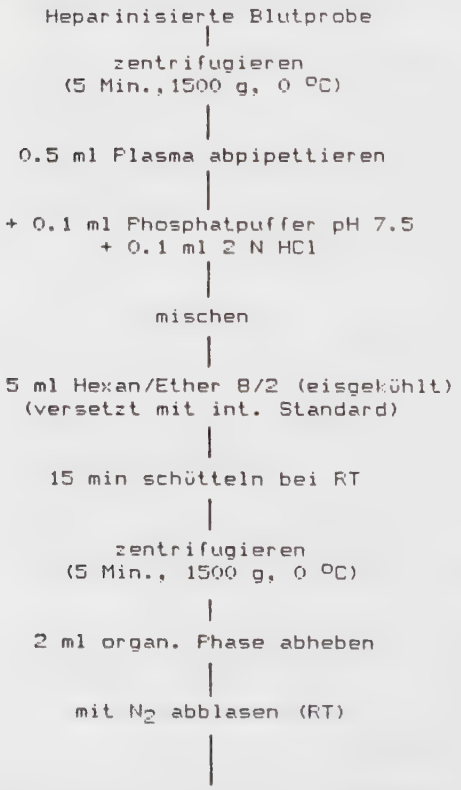
a) Plasma:

Der Arbeitsgang für die Aufarbeitung der Plasmaproben ist aus Abb.2.6. ersichtlich.

Als durchschnittliche prozentuale Wiederfindung (5, 20, 40, 100 mcg/Ibuprofen / ml Plasma) ermittelten wir 97.8 ± 4.7 %. Die durchschnittliche Tagesschwankung lag bei 4.65 %, die Nachweisgrenze bei 0.1 mcg/ml Plasma.

Typische Chromatogramme sind in Abb.6.1. im Anhang dargestellt.

Abb. 2.6. :Arbeitsschema für die Aufarbeitung von Plasmaproben:



b) Harn und Galle:

Die "direkte" Quantifizierung der Phase II - Metaboliten war nicht möglich, da keine entsprechenden Referenzsubstanzen verfügbar waren. Deswegen wurde in zwei Schritten zunächst die freie, unkonjugierte Fraktion von Muttersubstanz und Metaboliten und anschließend in einem separaten Arbeitsgang nach Hydrolyse der Konjugate (typischerweise mit Glukuronsäure, Sulfat, Glycin etc.) die Geamtmenge bestimmt. Die Differenz der beiden Bestimmungen entspricht dem konjugierten Anteil.

In der Literatur sind verschiedene Möglichkeiten zur Spaltung von Konjugaten beschrieben (1,78,82,89). Je nach Stabilität der betreffenden Substanzen können enzymatische (z.B. mit β-Glukuronidase / Arylsulphatase) oder chemische (sauer bzw. alkalisch) Verfahren zur Anwendung kommen.

Wir entschieden uns für die alkalische Hydrolyse mit 1N NaOH, weil

- nachgewiesen ist, daß die Ratte weder Glucuronide noch Sulfate bildet, sondern andere nicht näher spezifizierte Konjugate (89)
- die Spaltung innerhalb kurzer Zeit bei Raumtemperatur vollständig verläuft (82)
- chemische Verfahren allgemein kostengünstiger als enzymatische sind.

Das Arbeitsschema ist aus Abb.2.7. ersichtlich.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde arzneistoff-

freiem Harn bzw. Galle definierte Mengen von Ibuprofen und Metaboliten zugesetzt, so daß Konzentrationen von 50-500 mcg/ml Galle/Harn resultierten (n=4).

Die Nachweißgrenze lag für Ibuprofen und die beiden Metaboliten bei 0.5-1.0 mcg/ml Harn bzw. Galle.

Folgende Wiederfindungsraten wurden ermittelt:

I. Galle:

Konz: (mcg/ml)	Ibuprofen (%)	Met. A (%)	Met. B (%)
50	96.8±5.8	89.9±1.7	90.0±4.2
100	94.3±3.8	86.2±3.1	92.5±5.0
200	94.7±3.1	87.1±3.6	91.2±6.1
500	93.5±4.5	85.2±3.5	87.3±3.8

II. Harn:

Konz: (mcg/ml)	Ibuprofen (%)	Met. A (%)	Met. B (%)
50	93.2±4.3	90.1±4.5	92.2±3.1
100	95.3±3.7	92.2±4.0	90.3±4.4
200	92.2±4.8	94.3±5.4	88.3±5.6
500	97.1±3.4	87.2±6.1	86.1±5.9

Tagesschwankungen:

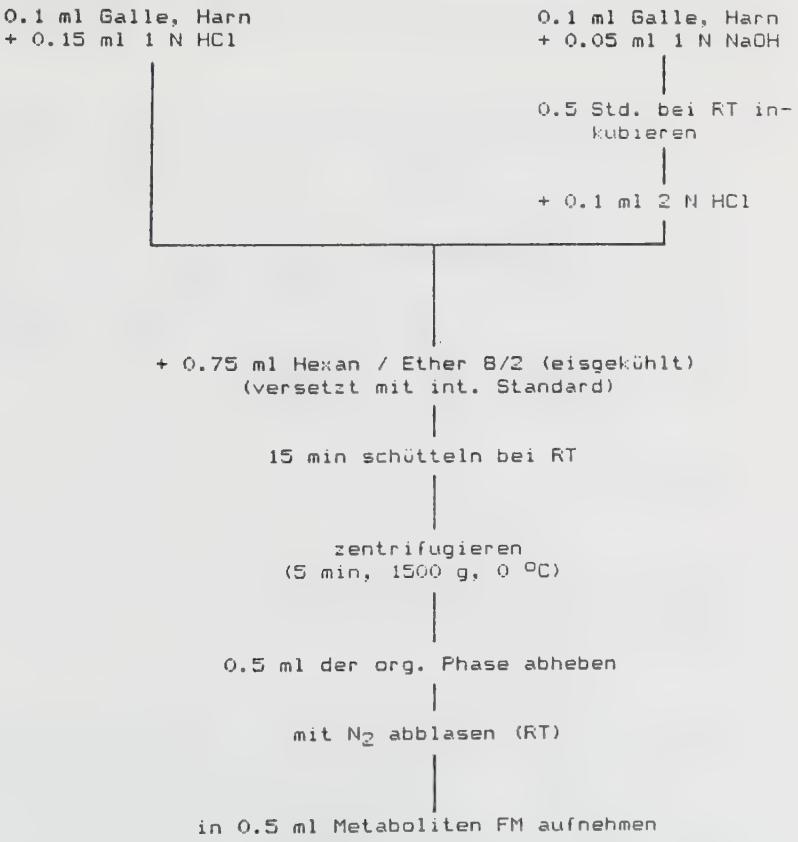
I. Galle:

Konz: (mcg/ml)	Ibuprofen (mcg/ml)	Met. A (mcg/ml)	Met. B (mcg/ml)
50	47.9±3.9	49.3±3.3	49.1±2.7
100	99.7±6.1	100.8±5.8	99.3±8.8
200	200.7±8.9	199.3±11.6	193.6±21.5
500	500.4±13.6	504.5±26.0	508.9±22.9

II. Harn:

Konz: (mcg/ml)	Ibuprofen (mcg/ml)	Met. A (mcg/ml)	Met. B (mcg/ml)
50	51.8±4.1	48.7±3.5	43.1±2.3
100	94.6±8.6	98.5±4.9	90.6±8.5
200	197.9±10.1	195.6±6.5	194.2±10.7
500	501.3±19.8	508.9±26.8	503.7±25.6

Abb.2.7. Arbeitschema für die Aufbereitung von Galle- und Harnproben



2.3.1.3. Analyse von Indometacin und seiner Metaboliten in biologischen Materialien

Neben radioaktiven Methoden (50,68,143) findet man in der Literatur zahlreiche chromatographische Verfahren (GC, HPLC) (10,52,55,118,119,124) zur Quantifizierung von Indometacin und seiner Metaboliten. Den nicht-radioaktiven Techniken zur Bestimmung der Metaboliten in der Galle (68,142,143), die sämtlich aus den sechziger Jahren stammen, fehlt die erforderliche Selektivität (fluorometrische Küvettenmessung nach Behandlung mit Alkali). Außerdem fällt auf, daß meist auf die Bestimmung von DMBI verzichtet wurde.

Die im folgenden beschriebene und für die pharmakokinetischen Untersuchungen verwendete Methode orientiert sich an SMITH und BENET (119).

Bezüglich der allgemeinen Vorbemerkungen, des Vorgehens zur Ermittlung der Wiederfindungsraten, der Tagesschwankungen sowie der Quantifizierung unbekannter Proben siehe Kap. 2.3.1.2..

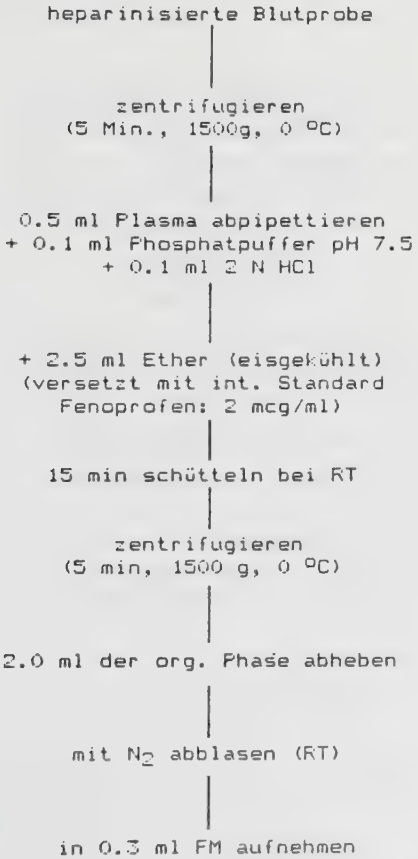
a) Plasma

Der Arbeitsgang für die Aufbereitung von Plasmaproben ist in Abb.2.8. dargestellt.

Die durchschnittliche prozentuale Wiederfindung (1, 5, 10, 20 mcg Indometacin / ml Plasma betrug 91.6 ± 4.3 %. Die durchschnittliche Tagesschwankung lag bei 4.8 %, die Nachweisgrenze bei 0.1 mcg/ml Plasma.

Typische Chromatogramme sind in Abb.6.2. im Anhang dargestellt.

Abb.2.8. : Arbeitsgang für die Aufbereitung von Plasmaproben



b) Galle und Harn:

Die Bestimmung erfolgte wie bereits unter 2.3.1.2.b beschrieben in zwei Schritten:

- Zuerst wurde durch direkte Extraktion nach Einstellung des pH Wertes mit Citratpuffer pH 5 der freie nicht Phase II - metabolisierte Anteil analysiert.

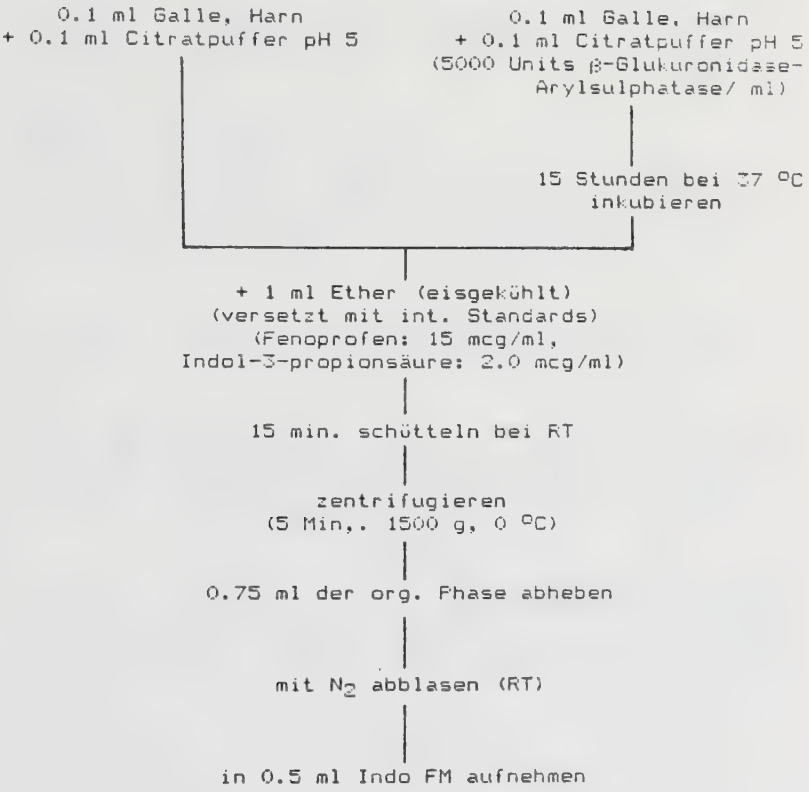
- In einem separaten Arbeitsgang erfolgte nach Spaltung der Konjugate die Bestimmung der Gesamtmenge.

Zur Hydrolyse der Indometacinkonjugate mußte aufgrund der chemischen Labilität der Substanz (115,143) auf enzymatische Methoden zurückgegriffen werden (β-Glucuronidase / Arylsulfatase, Fa. Boehringer GmbH, Mannheim) (119,131).

Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate wurde arzneistoffreiem Harn bzw. Galle definierte Mengen von Indometacin und Metaboliten zugesetzt, sodaß Konzentrationen von 50-500 mcg/ml (Indo, DMI) bzw. 1-50 mcg/ml (DBI, DMBI) Harn bzw. Galle resultierten und entsprechend dem Aufbereitungsschema (Abb.2.9.) analysiert.

Typische Chromatogramme sind in Abb.6.2. im Anhang dargestellt.

Abb.2.9. : Aufbereitungsschema für Galle und Harnproben



Folgende Wiederfindungsraten wurden ermittelt:

I. Galle:

Konz: (mcg/ml)	Indometacin (%)	DMI (%)	DBI (%)	DMBI (%)
1	-	-	63.0±5.7	37.2±5.5
10	-	-	67.3±7.2	32.3±4.5
25	98.1±4.7	77.6±2.9	69.1±2.0	40.1±6.8
50	92.3±5.5	82.0±4.2	67.3±5.2	31.1±7.3
100	101.5±8.4	86.6±2.5	71.7±5.8	-
250	105.7±0.8	84.5±2.3	-	-
500	95.8±3.4	-	-	-

II. Harn:

Konz: (mcg/ml)	Indometacin (%)	DMI (%)	DBI (%)	DMBI (%)
1	-	-	70.5±4.6	35.2±8.5
10	-	-	75.8±0.7	42.3±7.3
25	94.7±4.3	84.0±3.1	69.0±1.9	31.9±9.6
50	101.5±5.3	84.6±5.2	71.8±3.2	25.3±8.7
100	97.5±3.9	85.8±6.2	65.1±4.7	-
250	94.4±5.8	81.7±5.2	-	-

Die durchschnittlichen Tagesschwankungen und Nachweisgrenzen lagen bei:

Substanz	Tagesschwankung*)	Nachweisgrenze (mcg/ml Galle bzw. Harn
Indo	8.5 %	1.0
DMI	3.8 %	1.0
DBI	9.4 %	0.1
DMBI	10.4 %	0.1

*) ermittelt bei 4 Konzentrationen an 5 aufeinander folgenden Tagen

2.3.1.4. Analyse von IBU-S-AS in biologischen Materialien

Die Bestimmung von IBU-S-AS in biologischen Materialien erfolgte im wesentlichen analog des für Ibuprofen beschriebenen Verfahrens (siehe unter 2.3.1.2.).

Folgende Änderungen wurden vorgenommen:

- Aufgrund höherer Wiederfindungsraten wurde Ether zur Extraktion verwendet.

- Auf den Einsatz eines internen Standards wurde verzichtet.

- Die Quantifizierung von Phase-I-Metaboliten mußte unterbleiben, da keine Referenzsubstanzen zur Verfügung standen.

- Auf die Analyse von Plasmaproben wurde verzichtet, da aufgrund des bis jetzt rein experimentellen Charakters der Substanz im Rahmen der Fragestellung nur orientierende Untersuchungen zur biliären Elimination erfolgten.

Die Daten bezüglich Wiederfindung und Reproduzierbarkeit sind aus folgender Tabelle ersichtlich.

Konz. (mcg/ml)	Wiederfindung (%) (n=6) MW ± SD	Reproduzierbarkeit (mcg/ml) (n=5) (MW ± SD
I. Galle		
25	89.2 ± 3.2	22.0 ± 0.8
250	91.4 ± 1.9	264.3 ± 8.2
500	99.2 ± 1.6	525.2 ± 16.3
1000	86.6 ± 5.3	979.0 ± 48.9
II. Harn		
25	91.3 ± 4.2	24.2 ± 0.7
250	93.2 ± 2.8	243.5 ± 7.3
500	95.3 ± 1.6	511.2 ± 20.3
1000	90.4 ± 3.8	981.3 ± 31.2

Das Detektionslimit lag bei 2.0 mcg/ml Galle bzw. Harn.

2.3.1.5. Bestimmung der Gesamtgallensäuren:

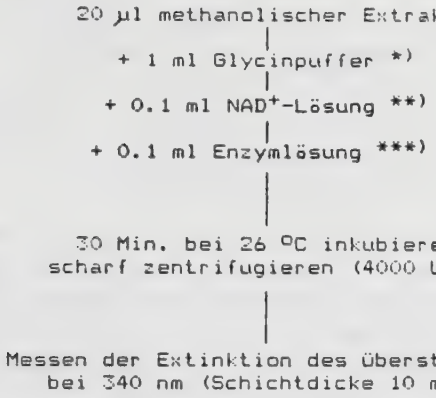
Die Bestimmung der Gesamtgallensäuren erfolgte enzymatisch nach einer Methode von PAUMGARTNER et al. (100) durch Reduktion der 3-a-Hydroxylgruppe des Steroidgerüstes der Gallensäuren mittels 3-a- Hydroxysteroid Dehydrogenase und anschließender Detektion bei 340 nm (Beckman DU-64 Spectophotometer) gegen Wasser.

a) Materialien:

Glycin	(Fa. Sigma, Taufkirchen)
Titriplex	(Fa. Merck, Darmstadt)
Hydrazinsulfat	(Fa. Sigma, Taufkirchen)
NAD^+	(Fa. Boehringer, Mannheim)
3-a-Hydroxysteroid-Dehydrogenase	(Fa. Sigma, Taufkirchen)
Cholsäure	(Fa. Sigma, Taufkirchen)

b) Methode:

Methanolische Galleextrakte (20 µl Galle + 200 µl Methanol) wurden mindestens 1 Stunde bei - 20° C aufbewahrt. Zur Analytik wurden 20 µl des methanolischen Überstandes eingesetzt.



Die Quantifizierung erfolgte durch Standardlösungen von Cholsäure in Methanol (0.5 mg, 1.0 mg, 2.0 mg / ml), die wie oben beschrieben behandelt wurden.

*) enthält pro Liter 1.0 Mol Glycin, 0.4 Mol Hydrazin, 0.0057 Mol Titriplex

**) 4 mg NAD^+ / ml Glycinpuffer

***) 1 mg 3-a-Hydroxysteroid-Dehydrogenase auf 1 ml Glycinpuffer

Die Reproduzierbarkeit der Methode bei Mehrfachbestimmung gleicher Proben betrug durchschnittlich 5.2 %.

2.3.2. Untersuchungen an der Ratte

2.3.2.1. Elimination und enterohepatische Rezirkulation

Tiere: Männliche SIV-50 Ratten (Savo Ivanovas, Kisslegg), Gewicht 250 - 300 g. Die Tiere wurden wie unter 2.2.2. gehalten und hatten permanent Zugang zu Futter und Wasser.

a) Versuche zur renalen Elimination:

Zur Ermittlung der renalen Elimination der untersuchten Pharmaka wurden die Tiere nach Applikation der Substanzen (entweder i.g. in 1% Methylcelluloseschleim suspendiert oder i.v. in Phosphatpuffer pH 7.5 gelöst) in einen Stoffwechselkäfig gesetzt. Auf diese Weise wird eine separate Sammlung von Harn und Faeces ermöglicht.
Die Konzentration der o.a. Darreichungsformen wurde so gewählt, daß 5 ml/kg Körpergewicht appliziert werden konnten.

Der Harn wurde nach 6, 12, 24, Stunden fraktioniert.

Dosierungen:	Ibuprofen	25 mg/kg Körpergewicht
	Indometacin	10 mg/kg Körpergewicht

b) Versuche zur biliären Elimination:

Um die Ableitung der Galle zu ermöglichen, wurde den Tieren in Ethernarkose nach Eröffnung des Bauchraumes und Präparierung des Ductus choledochus ein Polyethylen-

schlauch (PE 25) in den Gallengang bis unmittelbar unter die Hepaticusgabel geschoben und durch eine Ligatur fixiert (80,141).
Zusätzlich wurde bei den Tieren, denen die Substanz intravenös appliziert werden sollte, die Vena femoralis punktiert.

Zur Versuchsdurchführung wurden die vorbereiteten Tiere in einen Bollmann Restriktionskäfig (14) gesetzt.
Die Substanz wurde entweder als Suspension in 1%-iger Methylcelluloselösung (Tylose MH 300) intragastral oder gelöst in Phosphatpuffer pH 7.5 intravenös über den Femoraliskatheter verabreicht.

Die Galle wurde in zwei- bzw. vierstündigen Intervallen gesammelt, der Sammelharn in einer Fraktion über 24 Stunden.

Neben den Konzentrationen von Arzneistoff und Metaboliten wurde gemessen:

- das Volumen der einzelnen Gallefraktionen zur Ermittlung des Galleflusses
- der pH - Wert (pH-Meter 530, Fa. WTW, Weilheim in OB)
- der Gewichtsverlust der Tiere während des Versuches (24 Stunden)
- der Gehalt der einzelnen Fraktionen an Gesamtgallensäuren

Applizierte Dosen:

I. Ibuprofen:	25 mg/kg Körpergewicht	i.v.	(n=6)
	dito	i.g.	(n=6)
	100 mg/kg Körpergewicht	i.v.	(n=6)
	dito	i.g.	(n=6)
II. Indometacin:	5 mg/kg Körpergewicht	i.v.	(n=6)
	dito	i.g.	(n=6)
	10 mg/kg Körpergewicht	i.v.	(n=6)
	dito	i.g.	(n=6)
III. IBU-S-AS	41.3 mg/kg Körpergewicht	i.v.	(n=3)
	dito	i.g.	(n=3)

Da aus den Versuchen zur gastrointestinalen Toxizität (Kap. 2.2.3.) gravierende Unterschiede bezüglich der schädigenden Wirkung von Indometacin auf den Darm zwischen nüchternen und normal ernährten Ratten imponierten, wollten wir überprüfen, ob in unserem Versuchsmodell Unterschiede im biliären Eliminationsverhalten evident würden. Deswegen setzten wir die Tiere in zwei Versuchsreihen 24 Stunden vor der Kanülierung des Gallengangs vom Futter ab.

Dosierung: Indometacin 5 mg/kg i.g.
10 mg/kg i.g.

Die Konzentration der Darreichungsformen wurde so gewählt, daß 5 ml/kg Körpergewicht appliziert werden konnten.

c) Untersuchungen zur biliären Rezirkulation bei der Ratte

Nach Ermittlung des biliär eliminierten Anteils der verabreichten Dosis, interessierte im Rahmen der Problemstellung die Frage:

Welcher Anteil kann enterohepatisch rezirkulieren?

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde bei Tieren nach der oben beschriebenen Methode der Gallengang kanüliert. Außerdem wurde ein weiterer Polyethylenschlauch (PE 25) im distalen Ductus choledochus platziert, durch die Papille ins Duodenum vorgeschoben und durch eine Ligatur fixiert.

Zur Versuchsdurchführung setzten wir die Tiere in einen Restriktionskäfig. Über den distalen Choledochuskatheder wurde über einen Zeitraum von 5 Stunden 5 ml der aus einem unter b) beschriebenen Versuch gewonnenen Galle infundiert (Infusomat Fa. Braun, Melsungen). Die Infusionsgeschwindigkeit wurde soweit möglich dem aus den Versuchen b) ermittelten Gallenfluß angepaßt (Infusionsgeschwindigkeit b 2).

Die applizierte Galle enthielt folgende Konzentrationen an Arzneistoff und Metaboliten:

		gesamt (mg/ml)	freier Anteil (%)
I.	Ibuprofen:	2.24	22.0
	OH-Ibu.	0.63	24.7
	COOH-Ibu.	0.04	n.b.*)

II.	Indometacin:	0.22	95.5
	DMI:	0.16	n.b.
	DBI:	0.01	n.b.
	DMBI:	0.01	n.b.

*) n.b. nicht bestimmt

Die Galle wurde wie unter b) beschrieben fraktioniert; der Harn über 24 Stunden gesammelt.

2.3.3. Untersuchungen an weiteren Spezies

2.3.3.1. Elimination und enterohepatische Rezirkulation beim Hund

Tiere: Männliche Mischlingshunde, Gewicht 8 - 12 kg.

Nach einer Methode von THOMAS (125) und PREISIG (104) implantierten wir den Tieren eine Verweilkanüle ins obere Duodenum gegenüber der Papilla duodeni major und führte diese durch die Bauchdecke nach außen. Dadurch bestand die Möglichkeit, den Ductus choledochus nach Eröffnung der "Thomas-Fistel" wiederholt schmerzfrei zu kanülieren und die Galle vollständig nach außen abzuleiten. Zusätzlich wurde der Harn während des Versuches mittels eines Uretherkatheters kontinuierlich gesammelt. Ein peripherer Venenkatheter an der Vorderpfote ermöglichte die Entnahme von Blutproben zu definierten Zeitpunkten.

a) Plasmakonzentrationsverlauf, biliäre und renale Elimination

Sechsehn Stunden vor Versuchsbeginn bis zum Ende des Experimentes wurde den Hunden bei freiem Zugang zum Wasser das Futter entzogen.
Die Applikation der in 30 ml 0.3 M Phosphatpuffer pH 7.5 gelösten Untersuchungssubstanz erfolgte mittels eines Schlauches durch die "Thomas-Kanüle" über einen Zeitraum von 5 Minuten. Blutwerte wurden über 8 Stunden stündlich gewonnen, Harn und Galle stündlich fraktioniert.

Die für die Analytik nicht benötigte Galle wurde gepoolt und bei -20 °C aufbewahrt.

Dosierungen: Indometacin: 10 mg/kg Körpergewicht
Ibuprofen: 10 mg/kg Körpergewicht

b) Enterohepatische Rezirkulation beim Hund

In einer zweiten Veruchsreihe verabreichten wir den Tieren nach einer mindestens einwöchigen Wash-Out-Phase ein Aliquot der aus dem o.a. Experiment gesammelten Galle auf die oben beschriebene Weise über einen Zeitraum von 5 Minuten. Vor Applikation wurde der Gehalt der Galle an Wirksubstanz festgestellt (Tab. 2.3.).

Blut, Harn und Galle wurde nach dem gleichen Schema wie unter a) gesammelt.

Tab. 2.3. Versuchsparameter zur Bestimmung der enterohepatischen Rezirkulation (Rückgabe der arzneistoffhaltigen Galle)

I. Indometacin:

	Rolf	Trapp
Gewicht (kg)	8.7	11.1
appl. Gallemenge(ml)	40	30
Indometacin (mg)	24.0	40.0

Aus organisatorischen Gründen war es leider nicht möglich Rezirkulationsversuche mit ibuprofenhaltiger Galle durchzuführen.

2.3.3.2. Plasmaspiegel, biliäre und renale Elimination am Patienten

In die von der Ethikkommission der Universität genehmigte Studie wurden Patienten beiderlei Geschlechts der Chirurgischen und der Medizinischen Universitätsklinik einbezogen, denen temporär aus diagnostischen oder therapeutischen Gründen entweder eine naso-biliäre Sonde oder nach Ductus choledochus Revision eine transkutan- transhepatische Drainage gelegt worden war. Auf diese Weise war die externe Ableitung von Galle möglich (83,86).
Die Patienten wurden vor Versuchsbeginn durch übliche laborchemische und hämatologische Untersuchungen charakterisiert bzw. auf Ausschlußkriterien untersucht.

Allgemeine Patientendaten, Diagnose, auffällige Labordaten

sowie Begleitmedikation sind in den Tabellen 2.4., 2.5., 2.6. und 6.1. im Anhang zusammengestellt.

Tab.2.4. Patientendaten I:

Patient	Geschlecht	Alter	Gewicht	Größe	untersuchte Substanz
1 (H.K.)	m	65	82	180	Ibuprofen
2 (F.Sch.)	w	47	50	166	dito
3 (F.W.)	w	59	71	162	dito
4 (F.F.)	w	75	51	155	Indometacin

Tab.2.5. Patientendaten II:

Patient	Diagnose	Begleiterkrankungen	Technik der Galleableitung*)
1	Choledocho-lithiasis		a
2	chron. Pankreatitis, extrahepat. Cholestase	Hypotonie	a
3	Choledochoduodenostomie Sump Syndrom		b
4	Choledocho-lithiasis		a

*) a - naso-biliäre Sonde, b - T-Drain

Tab. 2.6. Patientendaten III. Abnorme Laborparameter:

Pat.: Serum:		1	2	3	4	Normwerte
Glucose	(mg/dl)			116		70 -100
GOT	(U/l)	70	73	17		1 - 15
GPT	(U/l)	119	185	25	27	1 - 17
LDH	(U/l)		221	219		95 -200
-GT	(U/l)	350	740	171	184	4 - 18
alk.Phosphatase	(U/l)	373	360	338		33 -105
a-Amylase	(U/l)		114		646	1 -110
Triglyceride	(mg/dl)		210	242		74 -172
Cholesterin	(mg/dl)		296		311	120 -250
Gesamt-Bilirubin	(mg/dl)	2.3	2.9		2.8	0.1- 1

Ausschlußkriterien:

- Magen-Darm-Ulzera
- Nierenerkrankungen (Creatinin Clearance < 30 ml)
- Diabetes (insulinpflichtig)
- Gravidität
- Herz- und Kreislauferkrankungen (Infarkt, Hypertonie)
- Allergische Reaktionen gegen die Substanzklasse

Die Patienten blieben 10 Stunden vor bis 4 Stunden nach Versuchsbeginn nüchtern um die Resorption der verabreichten Substanz nicht zu beeinträchtigen. Die Medikation wurde wie erforderlich beibehalten. Nach schriftlicher Einwilligung des Patienten wurde die Untersuchungssubstanz in Form eines Handelspräparates p.o. mit 200 ml Wasser verabreicht.

Dosierung: Ibuprofen: 600 mg
Indometacin: 50 mg

Galle und Harn wurden zu folgenden Zeiten gesammelt:

-Galle: 0, 2, 4, 8, 24 Stunden
-Harn : 0, 4, 8, 24 Stunden

Zusätzlich wurden zu folgenden Zeiten Blutproben mittels eines vor Versuchsbeginn gelegten Katheders am Unterarm gezogen:

Ibuprofen: 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 Stunden

Bei der Indometacin Patientin waren aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes keine Blutentnahmen möglich.

2.3.4. Statistische und pharmakokinetische Auswertung

Zur Auswertung wurden die gängigen Verfahren der Mittelwertbildung (MW), Standardabweichung (SD) sowie für vergleichende Untersuchungen F- bzw. t-Test und der Wilcoxon Vorzeichenrangtest verwendet (56,87).

Zur Auswertung der kinetischen Studien wurde das Programmpaket "Topfit" der Fa. Thomae, Biberach a.d. Riß herangezogen (15,62,63,64,140).

Folgende pharmakokinetische Parameter (108) wurden berechnet

lag-time (h)	: Totzeit nach Applikation, in der keine Aufnahme in das Meßkompartiment stattfindet
C_{max} (mcg/ml)	: Maximale Konzentration im Plasma zum Zeitpunkt t_{max}
t_{max} (h)	: Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration relativ zum Zeitpunkt der Substanzapplikation
$t_{1/2a}$ (h)	: Halbwertszeit der Verteilungsphase
$t_{1/2\beta}$ (h)	: Halbwertszeit der Ausscheidungsphase
V_d (l)	: Gesamtverteilungsvolumen
AUC (mcg*h/ml)	: Fläche unter der Plasmaspiegelkurve nach Applikation nach unendlich integriert
MTT (h)	: Mean Transit Time : arithmetisches Mittel aller Verweilzeiten von jedem Molekül einer gegebenen Dosis
Clearance (ml/min)	: totale Clearance: virtuelles Plasmavolumen, daß pro Zeiteinheit von einer Substanz vollständig geklärt ist

3. ERGEBNISSE

3.1. Ergebnisse der pharmakodynamischen Untersuchungen

3.1.1. Wirkung auf die Prostaglandinfreisetzung aus Mausperitonealmakrophagen

Nach Bestimmung der absoluten Mengen an Prostaglandin E_2 in den Kulturschalen wurde durch Vergleich mit der Lösungsmittelkontrolle (=100 % Hemmung) sowie der maximal stimulierten Proben (=0% Hemmung) die prozentuale Hemmung der Prostaglandinfreisetzung durch die Wirkstoffe errechnet (Tab. 3.1.).
Die aus den erhaltenen Konzentrations-Wirkungskurven (Abb. 3.1.) graphisch ermittelten IC_{50}-Werte sind in Tabelle 3.2. zusammengefaßt.

Indometacin ist bekannterweise einer der potentesten Hemmstoffe der PG-Freisetzung aus der Gruppe der NSAIDs und wurde deshalb als positive Kontrolle mit in den Versuch einbezogen.
Das Ibuprofen Derivat IBU-5-AS besitzt wie erwartet eine deutlich schwächere Wirkung als Ibuprofen selbst. Die IC_{50} liegt zwischen denen der beiden Komponenten Ibuprofen und 5-Aminosalicylsäure (Tab. 3.2.).

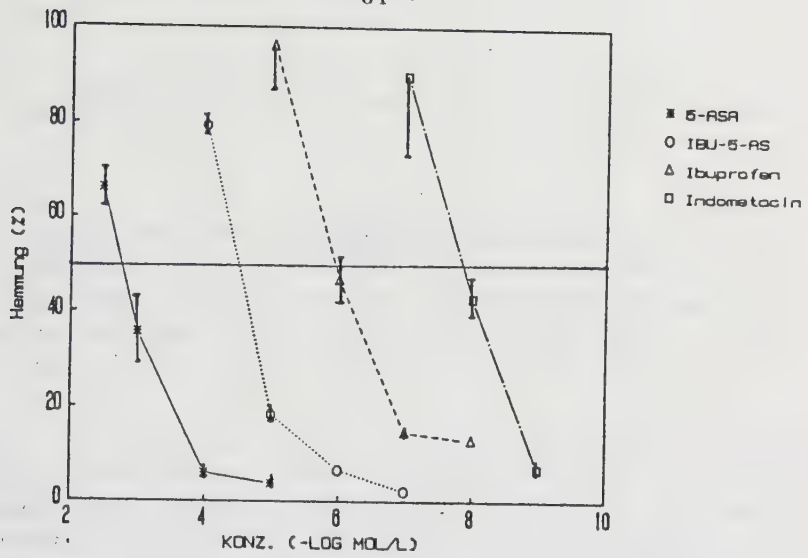
Tab. 3.1. : Beeinflussung der Prostaglandinfreisetzung aus Mausperitonealmakrophagen

Konz. (Mol/l)	Hemmung der Prostaglandinfreisetzung MW±SD (%) n=4			
	5-ASA	Ibu-5-AS	Ibuprofen	Indometacin
$3x10^{-3}$	66.3 (3.44)	-	-	-
10^{-3}	35.8 (7.06)	-	-	-
10^{-4}	6.1 (0.29)	79.5 (1.85)	-	-
10^{-5}	3.9 (0.14)	18.5 (1.57)	96.3 (8.77)	-
10^{-6}	-	6.8 (0.26)	46.9 (4.33)	-
10^{-7}	-	2.3 (0.18)	14.8 (0.27)	90.1 (17.71)
10^{-8}	-	-	13.1 (0.75)	43.2 (3.20)
10^{-9}	-	-	-	7.2 (0.21)

(-) nicht gemessen

Tab 3.2.: IC_{50} - Werte:

Substanz	IC_{50}	
	Mol/l	(-log Mol/l)
5-ASA	$8.2x10^{-4}$	3.09
IBU-5-AS	$3.3x10^{-5}$	4.48
Ibuprofen	$1.2x10^{-6}$	5.92
Indometacin	$1.3x10^{-8}$	7.89



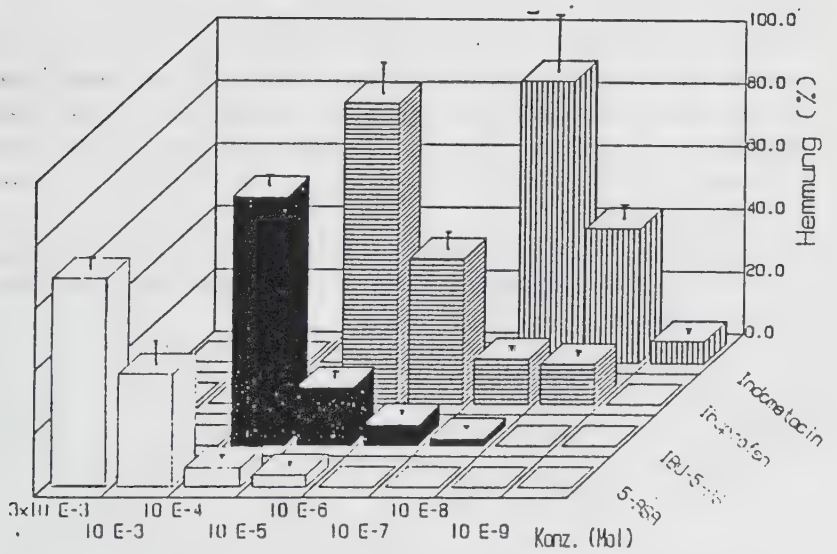


Abb. 3.1. Hemmung der Prostaglandinfreisetzung aus Mausperitonealmakrophagen in Abhängigkeit von der Dosis

3.1.2. Wirkung beim Carrageenin-induzierten Rattenpfotenödem

Zur Charakterisierung der antiphlogistischen Potenz bei akuten Entzündungen von IBU-S-AS wurden zwei Versuche durchgeführt. Die Ergebnisse sind im einzelnen in den Tab.3.3.,3.4. und 6.2. (im Anhang) und den Abb.3.2.,3.3. und 6.1. (im Anhang) dargestellt.

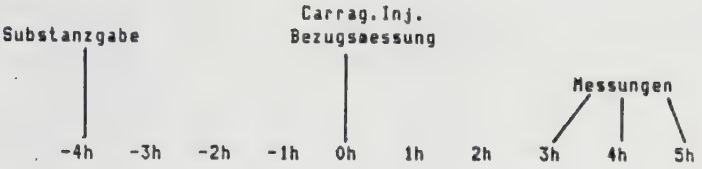
Wird die Substanz gleichzeitig mit der ödeminduktion i.g. appliziert (82.7 mg/kg), resultiert zu den Meßzeitpunkten eine signifikante Hemmung des ödems. Die Potenz der Vergleichssubstanzen Ibuprofen (50 mg/kg) und Indometacin (5 mg/kg) wird jedoch zu keinem Zeitpunkt erreicht.

Bei Applikation 4 h vor ödeminduktion wird der Wirkungsunterschied zwischen Ibuprofen und IBU-S-AS geringer. Der Effekt von IBU-S-AS dauert also vermutlich länger an. Ursächlich könnte eine protrahierte Resorption oder eine verzögerte Elimination sein.

Zu fast allen Meßzeitpunkten läßt sich eine Dosis-Wirkungsbeziehung zeigen, d.h. die höheren Dosen bewirken einen größeren Effekt.

Tab.3.3. Volumen der Rattenpfote (Versuch I):

Zeitschema:



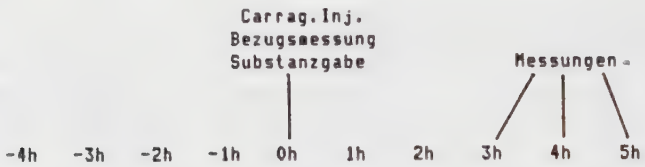
Substanz	Dosis (mg/kg KG)	Zunahme des Pfotenvolumens(ml) zur Zeit (MW ± SD) 3h	4h	5h	n
Kontrolle,Tylose		0.53 ± 0.05	0.79 ± 0.11	0.90 ± 0.08	7
Ibuprofen	25	0.30 ± 0.20[b]	0.53 ± 0.27[b]	0.67 ± 0.25[b]	7
Ibuprofen	50	0.30 ± 0.14[a]	0.34 ± 0.17[a]	0.50 ± 0.17[a]	7
IBU-5-AS	41.3	0.54 ± 0.21	0.59 ± 0.16[b]	0.77 ± 0.11[b]	7
IBU-5-AS	82.7	0.33 ± 0.11[a]	0.41 ± 0.12[a]	0.64 ± 0.10[a]	7

a = $p<0.01$
b = $p<0.05$

Substanz	Dosis (mg/kg KG)	Differenz des Pfotenvolumens zur Zeit relativ zur Kontrolle (ml) 3h	4h	5h	n
Ibuprofen	25	- 0.23	- 0.26	- 0.23	7
Ibuprofen	50	- 0.23	- 0.45	- 0.40	7
IBU-5-AS	41.3	+ 0.01	- 0.20	- 0.13	7
IBU-5-AS	82.7	- 0.20	- 0.38	- 0.26	7

Tab.3.4. Volumen der Rattenpfote (Versuch II):

Zeitschema:



Substanz	Dosis (mg/kg KG)	Zunahme des Pfotenvolumens(ml) zur Zeit (MW ± SD)			n
		3h	4h	5h	
Kontrolle,Tylose I		0.50 ± 0.13	0.61 ± 0.15	0.75 ± 0.17	7
Kontrolle,Tylose II		0.69 ± 0.12	0.73 ± 0.15	0.73 ± 0.10	7
Indometacin	5.0	0.30 ± 0.13[b]	0.31 ± 0.13[a]	0.33 ± 0.14[a]	7
Ibuprofen	50	0.27 ± 0.05[a]	0.31 ± 0.04[a]	0.31 ± 0.07[a]	7
IBU-5-AS	82.7	0.47 ± 0.11[a]	0.50 ± 0.16[b]	0.53 ± 0.14a	7

Kontrolle I: Kontrollgruppe für Indometacin-Gruppe
Kontrolle II: " " Ibuprofen und IBU-5-AS

a = $p<0.01$
b = $p<0.05$

Substanz	Dosis (mg/kg KG)	Differenz des Pfotenvolumens(ml) zur Zeit relativ zur Kontrolle			n
		3h	4h	5h	
Indometacin	5	- 0.20	- 0.30	- 0.42	7
Ibuprofen	50	- 0.42	- 0.42	- 0.42	7
IBU-5-AS	82.7	- 0.22	- 0.23	- 0.20	7

Abb.3.2. RATTENPFOTENOEDEM (VERSUCH I)

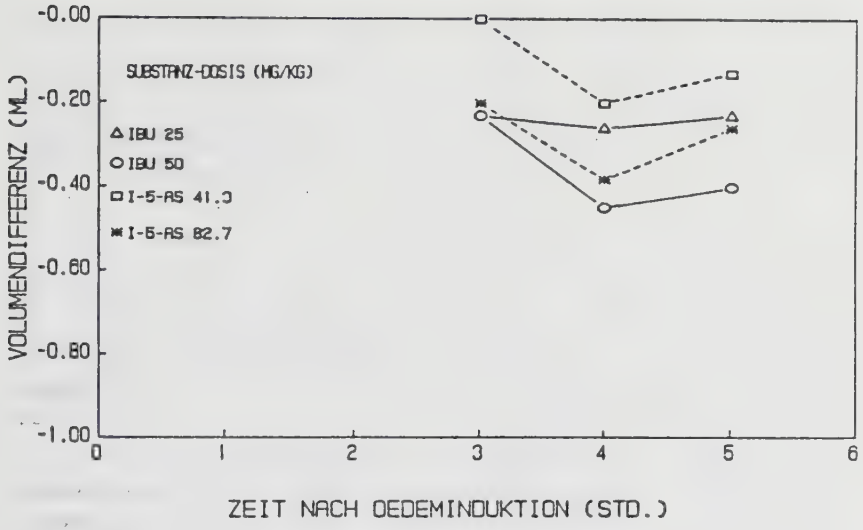
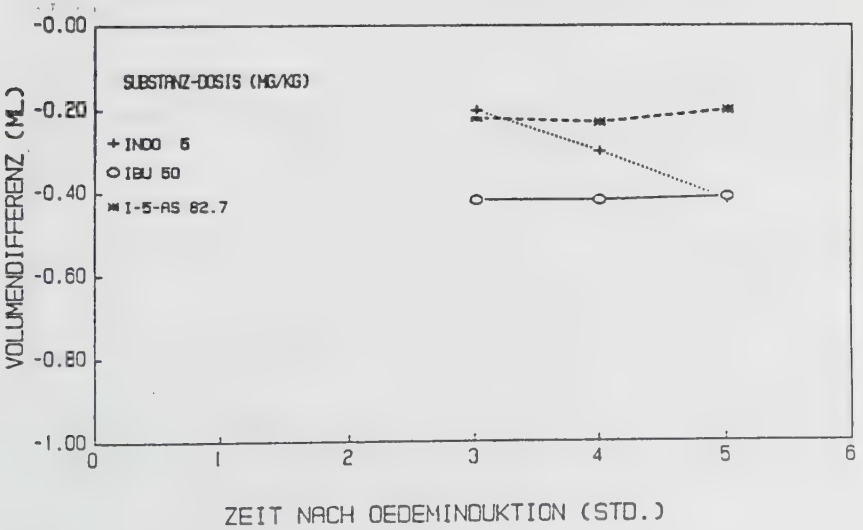


Abb.3.3. RATTENPFOTENOEDEM (VERSUCH II)



3.1.3. Gastrointestinale Toxizität bei der Ratte

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur gastrointestinalen Toxizität bei der Ratte sind im einzelnen aus den Tab.3.5., 3.6. und den Abb.3.4.,3.5. ersichtlich.

a) Gastrale Toxizität

Indometacin und Ibuprofen verursachten dosisabhängig gastrotoxische Effekte sowohl bei nüchternen als auch bei normal ernährten Tieren.
Nach Gabe von Indometacin in der höchsten geprüften Dosierung (16 mg/kg) wurde bei normal ernährten Tieren eine höhere Ulkuszahl als bei gefasteten Tieren ermittelt. Auffällig ist die hohe Standardabweichung.

IBU-5-AS erwies sich selbst in der höchsten untersuchten Dosierung (496.5 mg/kg - äquimolar zu 300 mg/kg Ibuprofen) als sehr gut verträglich; es bestand kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe.

Beim Vergleich der nüchternen mit den normal ernährten Kontrollgruppen fällt auf, daß die hungernden Tiere auch ohne Behandlung gastrale Ulzera entwickeln.

b) Intestinale Toxizität

Bei fastenden Tiere entwickelten sich in keinem Fall intestinale Ulzerationen.
Selbst nach Gabe von 16 mg/kg Indometacin war kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle sichtbar.

Bei normal ernährten Tieren liegen die Verhältnisse grundlegend anders. Wir fanden eine dosisabhängige ulzerogene Wirkung von Indometacin und Ibuprofen. Nach Gabe von 16 mg/kg Indometacin entfielen annähernd 50 % des Dünndarms auf ulzerierte Areale.

IBU-5-AS erwies sich intestinal als ebenso verträglich wie gastral. Selbst die äquimolare Dosis zu 300 mg/kg Ibuprofen verursachte keine Ulzerationen. Es bestand kein Unterschied zur Kontrollgruppe.

Tab. 3.5. Gastrointestinale Toxizität (Tiere nüchtern)

Substanz	Dosis (mg/kg KG)	(Mol/kg KG)	Ulkuszahl Substanzgruppe MW	SD	Kontrollgruppe MW	SD	int. Ulzerationen (%) Substanzgruppe MW	SD	Kontrollgruppe MW	SD	N*)
Indometacin	5.0	$1.4*10^{-5}$	3.17	1.83	3.00	1.77	0.04	0.10	0.92	1.17	6 (8)
	10.0	$2.8*10^{-5}$	4.60	2.12[a]	1.33	1.32	0.00	0.00	0.00	0.00	10 (9)
	16.0	$4.5*10^{-5}$	7.17	5.27[b]	0.50	0.58	0.28	0.34	0.31	0.43	6 (4)
Ibuprofen	25.0	$12.1*10^{-5}$	2.10	1.91	2.50	1.78	0.00	0.00	0.00	0.00	10 (10)
	100.0	$48.5*10^{-5}$	3.90	5.63	0.80	1.14	0.04	0.14	0.03	0.10	10 (10)
	300.0	$145.6*10^{-5}$	17.70	15.73[a]	1.60	1.84	0.21	0.35	0.04	0.13	10 (10)
IBU-5-AS	41.3	$12.1*10^{-5}$	1.30	1.57	2.50	1.78	0.00	0.00	0.00	0.00	10 (10)
	496.5	$145.6*10^{-5}$	2.00	2.54	1.60	1.84	0.05	0.15	0.04	0.13	10 (10)

Tab. 3.6. Gastrointestinale Toxizität (Tiere nicht nüchtern)

Substanz	Dosis (mg/kg KG)	(Mol/kg KG)	Ulkuszahl Substanzgruppe MW	SD	Kontrollgruppe MW	SD	int. Ulzerationen (%) Substanzgruppe MW	SD	Kontrollgruppe MW	SD	N*)
Indometacin	5.0	$1.4*10^{-5}$	4.50	1.64[a]	0.30	0.48	1.37	1.54[b]	0.04	0.14	6 (10)
	10.0	$2.8*10^{-5}$	2.60	1.71[a]	0.30	0.95	23.23	22.73[a]	0.09	0.20	10 (10)
	16.0	$4.5*10^{-5}$	20.17	13.41[b]	0.00	0.00	46.19	11.40[a]	0.00	0.00	6 (4)
Ibuprofen	25.0	$12.1*10^{-5}$	0.20	0.42	0.30	0.67	0.08	0.25	0.00	0.00	10 (10)
	100.0	$48.5*10^{-5}$	4.10	3.98[a]	0.20	0.42	5.25	9.06[b]	0.05	0.16	10 (10)
	300.0	$145.6*10^{-5}$	15.10	14.84[a]	1.00	0.82	29.21	12.65[a]	0.05	0.16	10 (10)
IBU-5-AS	41.3	$12.1*10^{-5}$	0.40	0.97	0.30	0.67	0.00	0.00	0.00	0.00	10 (10)
	496.5	$145.6*10^{-5}$	1.10	1.29	1.00	0.82	0.43	1.09	0.05	0.16	10 (10)

*) Anzahl der Tiere pro Gruppe (in Klammern Anzahl der Tiere der Kontrollgruppe

t-Test:
a: $p < 0.01$
b: $p < 0.05$

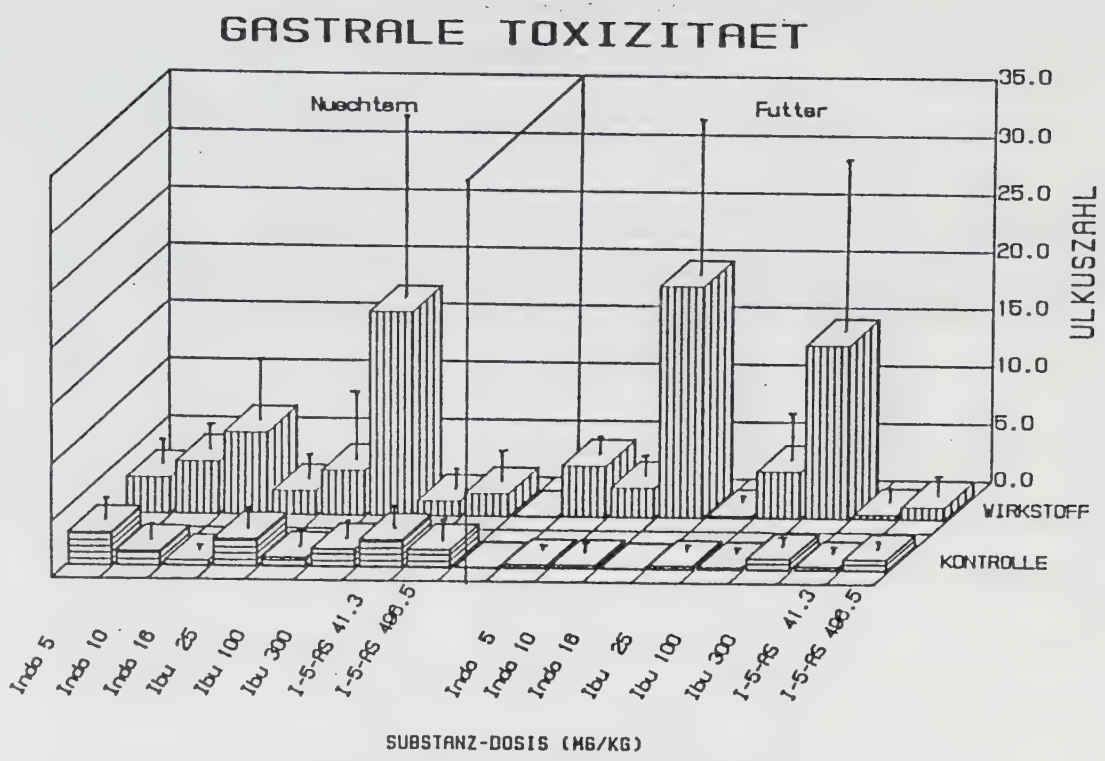


Abb. 3.4. Gastrale Toxizität bei der Ratte

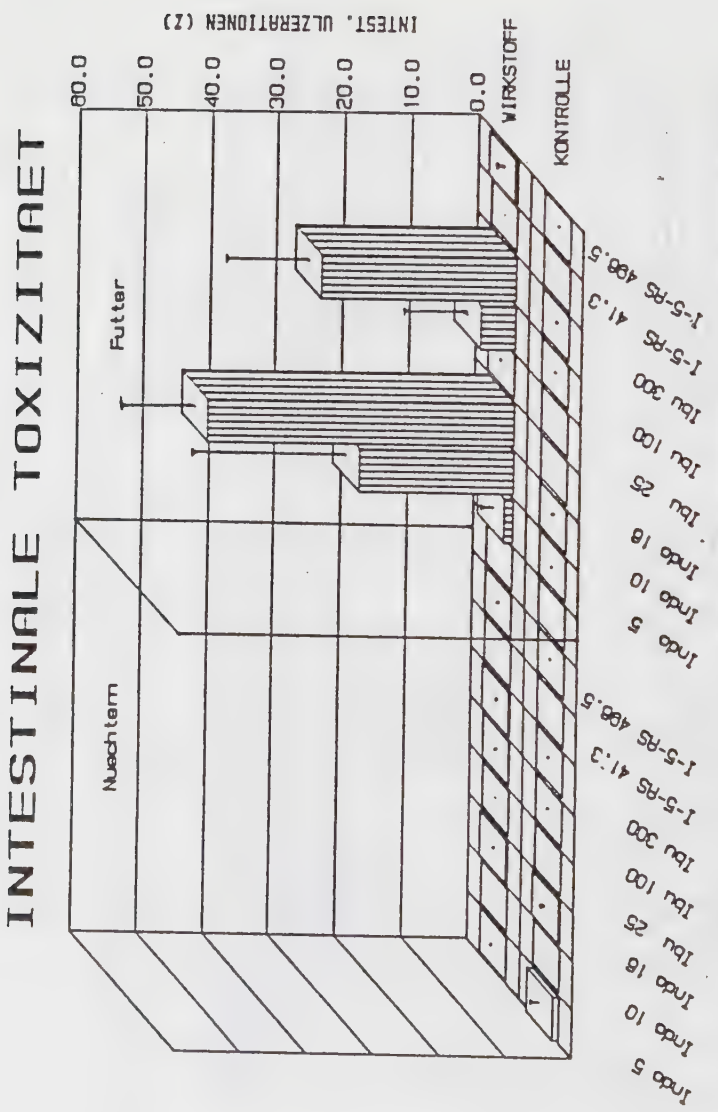


Abb. 3.5. Intestinale Toxizität bei der Ratte

3.2. Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen

3.2.1. Untersuchungen an der Ratte

3.2.1.1. Elimination und enterohepatische Rezirkulation

Zur Überprüfung unserer in der Einleitung formulierten Hypothese, daß die Intensität intestinaler Schäden nichtsteroidaler Antirheumatika vom Ausmaß der enterohepatischen Rezirkulation abhängt, war es notwendig, den Anteil an Muttersubstanz und Metaboliten zu definieren, der biliär eliminiert wird.

Dazu wurden die Substanzen in verschiedenen Dosierungen sowohl intragastral als auch intravenös zugeführt um die Bioverfügbarkeit nach peroraler Gabe abschätzen zu können.

Am Beispiel von Ibuprofen und Indometacin wurde untersucht, welcher Anteil nach intraduodenaler Gabe arzneistoffhaltiger Galle (in einem Vorversuch gewonnen) wiederum biliär eliminiert wird, also enterohepatisch rezirkulieren kann.

Orientierend wurde zusätzlich am Beispiel des Indometacins geprüft, ob die in Kapitel 3.1.3. dargestellten gravierenden Unterschiede hinsichtlich der intestinalen Toxizität bei nüchternen bzw. gefütterten Ratten auf Unterschiede im Metabolismus und/oder der biliären Elimination zurückgeführt werden können.

Außer den Konzentrationen von Muttersubstanz und Metaboliten in der Galle wurde bei jeder Versuchsreihe der

Gallefluß und der pH - Wert der Galle ermittelt und mit Kontrollgruppen verglichen.

3.2.1.1.1. Ibuprofen

Untersucht wurde die biliäre Elimination bei frisch operierten Ratten mit einer Gallengangsfistel nach Applikation von 25 mg/kg und 100 mg/kg Körpergewicht.

Nach der hohen Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht wurde sowohl nach intragastraler als auch nach intravenöser

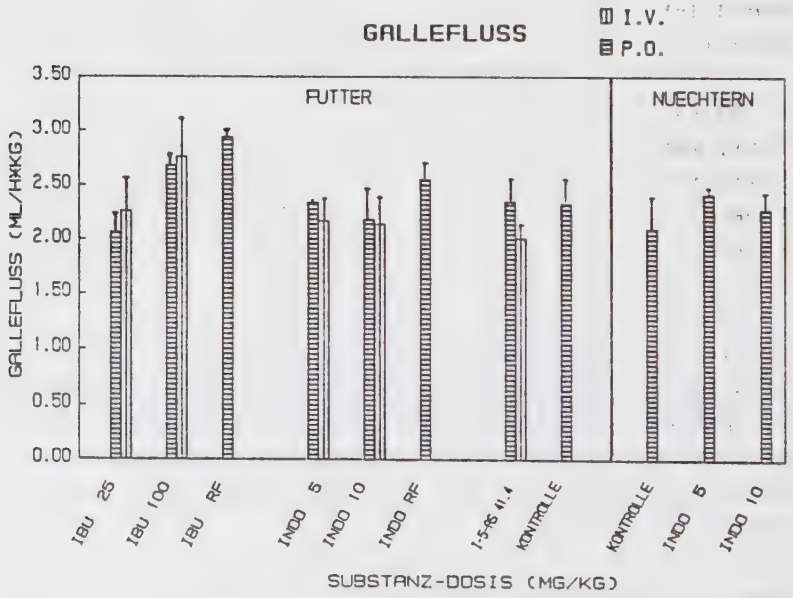


Abb. 3.6. Durchschnittlicher stündlicher Gallefluß der Fistelratten

Tab. 3.7. Gewichtsverlust und Gallefluß der Fistelratten
(MW ± SD)

Substanz	Dosierung (mg/kg)	Appl.	Gewicht vor Versuch (g)	Gewichtsverlust (%)	Gallefluß (ml/h*kg)	N
FUTTER						
Kontrolle		p.o.	268.0 (7.63)	18.3 (3.79)	2.33 (0.26)	6
IBU	25	p.o.	297.7 (5.92)	17.1 (0.50)	2.06 (0.18)	6
	25	i.v.	292.0 (7.16)	16.4 (2.13)	2.26 (0.32)	6
	100	p.o.	273.8 (6.34)	17.1 (0.57)	2.68 (0.14)[a]	6
	100	i.v.	281.3 (4.50)	17.2 (1.88)	2.76 (0.34)[a]	6
	RF*)	i.d.	271.0 (19.0)	18.1 (2.12)	2.94 (0.03)[b]	3
INDO	5	p.o.	287.6 (8.79)	18.2 (1.29)	2.34 (0.04)	4
	5	i.v.	273.0 (5.31)	18.0 (1.04)	2.17 (0.20)	6
	10	p.o.	232.3 (5.54)	17.1 (2.51)	2.18 (0.31)	6
	10	i.v.	253.8 (6.79)	19.3 (1.88)	2.14 (0.33)	6
	RF *)	i.d.	271.3 (4.51)	17.7 (0.87)	2.55 (0.15)	3
IBU-5-AS	41.4	p.o	277.7 (9.29)	18.6 (2.11)	2.35 (0.22)	3
	41.4	i.v.	277.5 (7.78)	17.0 (0.98)	2.01 (0.13)	3
NÜCHTERN						
Kontrolle		p.o.	267.0 (24.7)	11.9 (2.21)	2.10 (0.31)	6
INDO	5	p.o.	271.7 (7.23)	10.4 (1.00)	2.42 (0.07)	4
	10	p.o.	275.8 (6.70)	12.2 (1.74)	2.28 (0.14)	3

*) Rückführung von 5 ml gepoolter Galle aus i.v. Versuch (i.d.=intra duodenal)

a) $p < 0.05$
b) $p < 0.01$

Applikation eine signifikante Zunahme des Galleflusses ($p<0.05$) beobachtet, die nach der Rückführung arzneistoffhaltiger Galle noch deutlicher ausfiel ($p<0.01$) (Abb. 3.6. und Tab. 3.7.).

Insgesamt schieden die Tiere mit Galle und Harn zwischen

Tab. 3.8. Biliäre und renale Ausscheidung der Gallefistelratten in 24 Stunden nach Applikation von Ibuprofen (MW ± SD)

	Gesamtausscheidung (% der Dosis)		
	Galle	Harn	Gesamt
25 mg/kg p.o.	39.3 (4.88)	28.8 (8.46)	68.1 (10.93)
i.v.	47.6 (5.78)	31.6 (11.93)	79.2 (8.23)
100 p.o.	41.3 (5.88)	28.4 (4.42)	69.7 (5.07)
i.v.	59.0 (5.69)	16.4 (1.88)	75.4 (5.08)
Gallerückf. [a)]	48.6 (3.51)	46.2 (2.61)	94.8 (1.01)

	Galle (% der Dosis)				
Dosis, Appl.	Ibuprofen frei	Ibuprofen gesamt	OH-Ibuprofen	COOH-Ibuprofen	Gesamt
25 mg/kg p.o.	0.9(0.38)	15.4(2.44)	18.6 (1.69)	5.4 (1.86)	39.6 (5.40)
i.v.	1.9(0.46)	12.8(2.62)	25.7 (2.87)	9.3 (1.14)	47.6 (5.78)
100 mg/kg p.o.	3.2(1.60)	16.8(2.89)	23.9 (5.60)	0.5 (0.11)	41.3 (5.88)
i.v.	5.4(3.46)	26.1(4.97)	31.4 (5.35)	1.5 (0.24)	59.0 (5.68)
Gallerückf. [a)]	3.7(2.54)	21.6(2.78)	26.4 (1.47)	0.6 (0.38)	48.3 (3.42)

[a)] bezogen auf appl. Ibuprofenmenge

69.7 ± 5.07 und 79.2 ± 8.23 % der Dosis aus (Tab.3.8. und Abb. 3.7.). Nach Applikation arzneistoffhaltiger Galle wurden insgesamt durchschnittlich 94.8 % der verabreichten Ibuprofenmenge wiedergefunden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur renalen Elimination bei intakten Tieren (ohne Galleableitung) sind in Tab. 6.4. im Anhang zusammengefaßt. In dieser Versuchsanordnung wurde nach p.o. bzw. i.v. Gabe durchschnittlich 54.6 bzw. 58.6 % der Dosis im Harn der Tiere in 24 Stunden wiedergefunden - der größte Teil (49.9 bzw. 50.3 %) als hydroxylierter Metabolit.

Im Rahmen der Problemstellung interessierte vor allem die quantitative Erfassung von Ibuprofen und Biotransformationsprodukten in der Galle.

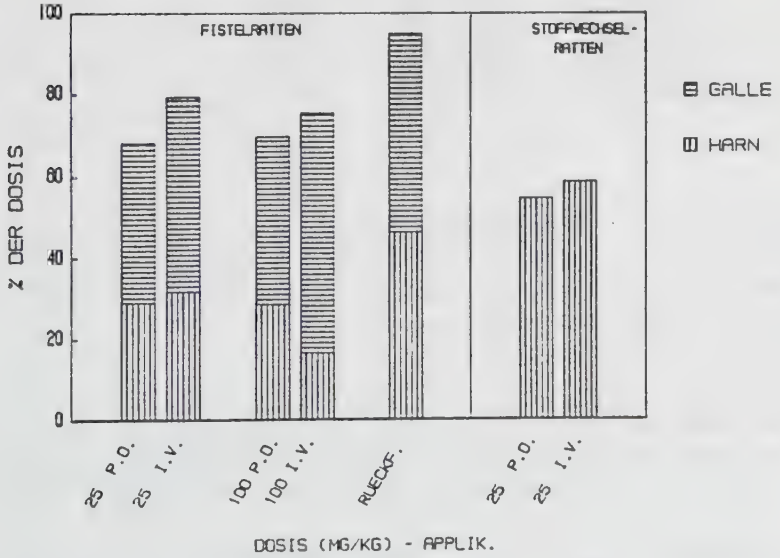


Abb. 3.7. Gesamtausscheidung mit Galle und Harn (24 Stunden) von Ibuprofen und Metaboliten

Zwischen 12.8 und 16.8 % der Dosis wurden als Gesamtibuprofen (freier Anteil + Phase-II Metaboliten) ausgeschieden. Bei der hohen Dosis von 100 mg/kg i.v. wurde möglicherweise aufgrund einer Sättigung des metabolisierenden Systems im Mittel 26.1 % der Dosis als Gesamtibuprofen ausgeschieden (Tab. 3.8. und Abb. 3.8.).

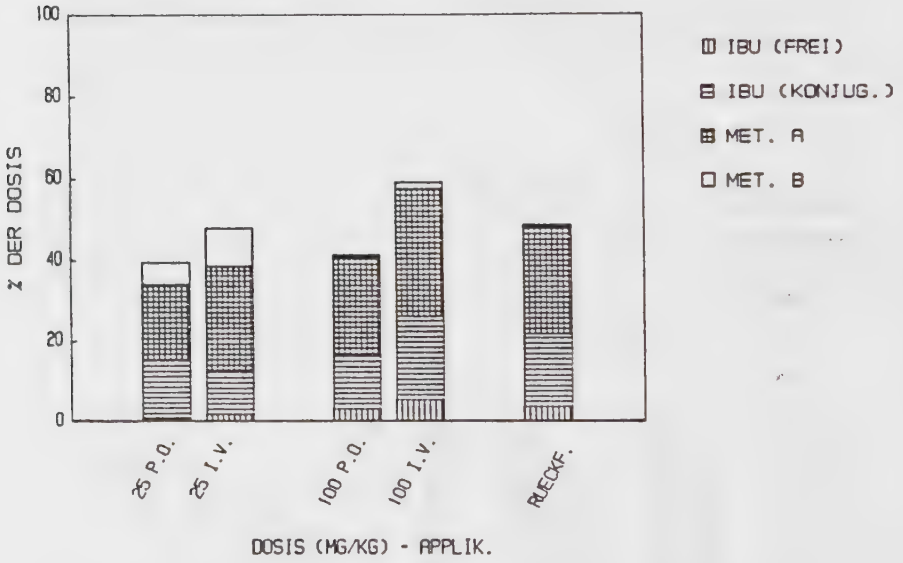


Abb. 3.8. Biliäre Elimination von Ibuprofen und Metaboliten über 24 Stunden

Aus den Abb. 3.9. und 6.6. im Anhang ist der zeitliche Konzentrationsverlauf der Ibuprofen Galleausscheidung ersichtlich.

Nach oraler Applikation sind die Flächen unter den Kurven bei beiden untersuchten Dosierungen annähernd gleich groß. Nach 100 mg/kg erfolgt die Elimination geringfügig

protrahiert, wahrscheinlich verursacht durch eine verzögerte Resorption. In Abb. 3.8. und 3.9. fällt auf, daß nach i.v. Gabe von 100 mg/kg prozentual deutlich mehr Ibuprofen mit der Galle eliminiert wird als nach 25 mg/kg. Der zeitliche Konzentrationsverlauf im Rückführungsexperiment ähnelt wie erwartet den Kurven nach oraler Gabe.

Der als OH-Metabolit biliär eliminierte Anteil bewegt sich bei allen durchgeführten Versuchen in einem relativ engen Bereich (Tab. 3.8. und Abb. 3.8.). Nach oraler Gabe traten durchschnittlich 18.6 bzw. 23.9 %, nach i.v. Gabe 25.7 bzw. 31.4 % der Dosis als hydroxyliertes Ibuprofen in der Galle auf.
Im Rückführungsversuch wurden im Mittel 26.4 % der verabreichten Ibuprofenmenge als OH-Metabolit biliär ausgeschieden.

Die Menge an carboxyliertem Ibuprofen (Metabolit B) ist in allen durchgeführten Versuchen von untergeordneter Bedeutung. Nur in der niedrigen Dosierung wurden sowohl nach p.o. als auch nach i.v. Gabe mehr als 5 % der Dosis mit der Galle eliminiert (Tab. 3.8. und Abb. 3.8.).

Der Vollständigkeit halber wurde auch im Harn der Tiere Ibuprofen und Metaboliten quantifiziert (Tab. 6.3. und Abb. 6.5. im Anhang).

Die renal eliminierte Fraktion der applizierten Dosis stimmt nach p.o. Gabe der Substanz in beiden Dosierungen sehr gut überein. Wird Ibuprofen intravenös verabreicht, gewinnt die renale Elimination an Bedeutung, besonders ausgeprägt nach der hohen Dosis von 100 mg/kg.

Die im Rückführungsexperiment im Harn auftretende Menge von 46 % der Dosis, die deutlich höher liegt als bei den anderen Versuchsreihen (Tab. 3.8. und Abb. 3.7.), erklärt

Tab. 3.9. Ausscheidung von Ibuprofen (frei + Konjugate mit der Galle in 24 Stunden (MW ± SD)

Dosis, Appl.	G_1 (0-4 Std)	G_2 (4-8 Std.)	G_3 (8-24 Std.)	Gesamt (0-24 Std.)
	(% der Dosis)			
25 mg/kg p.o.	4.2 (1.49)	7.6 (0.94)	3.6 (0.57)	15.4 (2.44)
i.v.	12.7 (2.61)	0.1 (0.01)	0	12.8 (2.62)
100 p.o.	3.2 (1.53)	5.4 (1.83)	8.3 (2.89)	16.9 (2.89)
i.v.	23.6 (4.17)	2.0 (1.22)	0.4 (0.17)	26.1 (4.97)
Rückführung *)	6.8 (1.97)	8.9 (3.50)	4.6 (3.25)	21.6 (2.78)

*) bezogen auf appl. Ibuprofenmenge

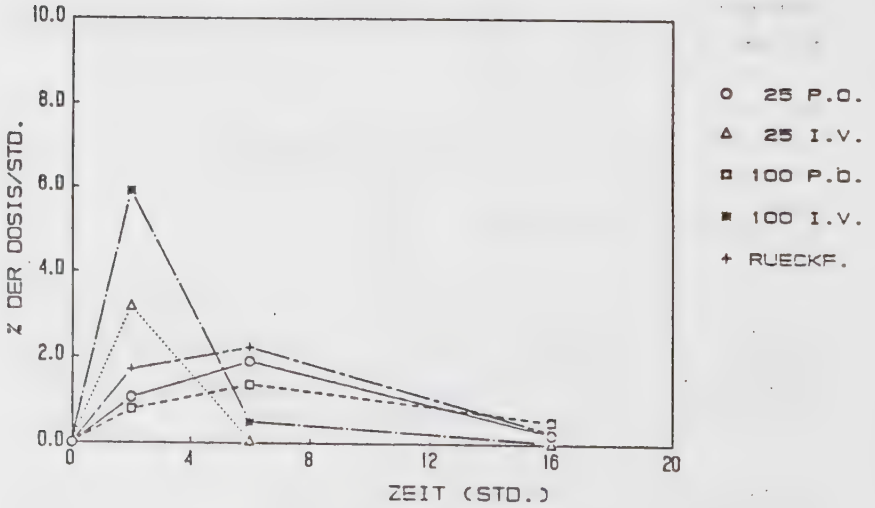


Abb. 3.9. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Ibuprofen in der Galle

sich durch den relativ hohen Gehalt der applizierten Galle an Metabolit A (Kap. 2.3.2.1.c), der offensichtlich zu einem beträchtlichen Teil resorbiert wird.

3.2.1.1.2. Indometacin

Indometacin ist eine pharmakologisch sehr gut charakterisierte Substanz. Zur Pharmakokinetik, dem Metabolismus von Indometacin sowie zur intestinalen Nebenwirkungspotenz liegen zahlreiche Arbeiten vor (18, 32, 42, 43, 48, 68, 112, 115, 136, 141, 142).
Die im folgenden aufgeführten Ergebnisse der Untersuchungen zur biliären Elimination von Indometacin unter unseren Versuchsbedingungen sollten dazu dienen, Vergleiche mit den anderen Substanzen zu ermöglichen.

Dazu wurden wie beim Ibuprofen zwei Dosierungen (5 und 10 mg/kg Körpergewicht) auf zwei Applikationswegen verabreicht. Zusätzlich wurde ein Rezirkulationsexperiment durchgeführt, indem 5 ml der in einem o.a. Versuch gewonnene arzneistoffhaltige Galle eingesetzt wurden.

Da, wie in Kap. 3.1.3. ausgeführt, das Ausmaß intestinaler Ulzerationen bei nüchternen Tieren einerseits und normal gefütterten Tieren anderseits drastisch differiert, wurde untersucht, ob Unterschiede im Gallefluß, Galle-pH, der eliminierten Gallensäuremenge oder im Eliminationsverhalten von Indometacin ursächlich für die unterschiedliche Inzidenz intestinaler Läsionen sein könnte.

Zu diesem Zweck wurden die o.a. Dosierungen Tieren p.o. appliziert, die 24 Stunden vor Versuchsbeginn kein Futter

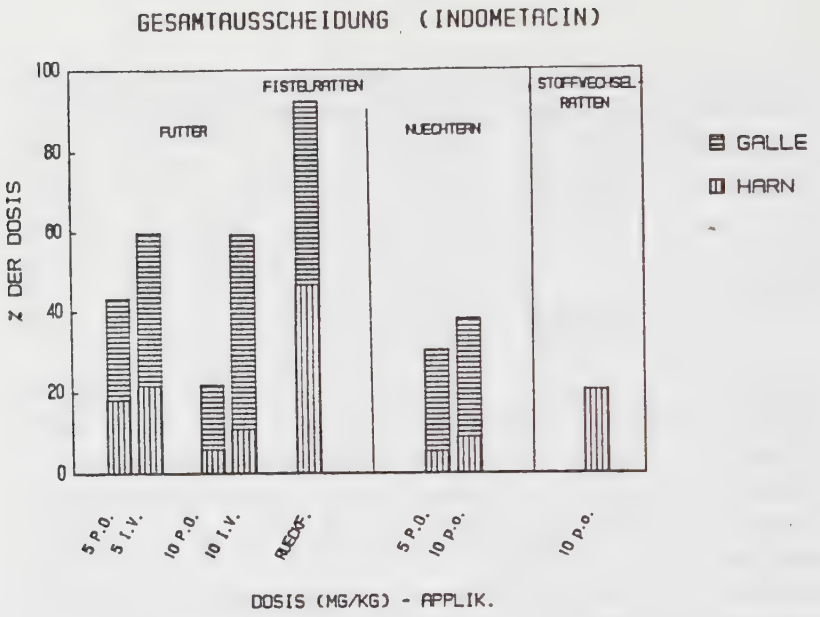


Abb. 3.10. Gesamtausscheidung über Galle und Harn von Indometacin und Metaboliten in 24 Stunden

erhielten.

Nach intravenöser Injektion von 5 bzw. 10 mg/kg Indometacin (n=6) wurden mit Galle und Harn über 24 Stunden insgesamt durchschnittlich etwa 59 % der Dosis ausgeschieden (Tab. 3.10. und Abb. 3.10.).

Nach i.g. Gabe wurde wesentlich weniger wiedergefunden, bei 10 mg/kg (n=6) nur durchschnittlich 21.9 % der Dosis.

Nüchterne Tiere schieden über 24 Stunden durchschnittlich 38.1 % einer Dosis von 10 mg/kg (n=4) mit Galle und Harn aus (Tab. 3.10.). Die Resorptionsquote scheint unter nüchternen Bedingungen günstiger zu sein.

Tab. 3.10. Ausscheidung der Fistelratten über 24 Stunden (MW±SD) (Indometacin)

	Gesamtausscheidung		
	Galle	Harn (% der Dosis)	Gesamt
Futter:			
5 mg/kg p.o.	25.0 (5.99)	18.2 (7.63)	43.2 (11.78)
i.v.	38.0 (3.52)	21.6 (2.79)	59.4 (4.20)
10 mg/kg p.o.	15.9 (7.21)	6.0 (1.86)	21.9 (7.63)
i.v.	48.1 (9.46)	11.0 (6.20)	59.1 (12.19)
Gallerückf. *)	45.6 (9.71)	46.6 (5.87)	92.2 (10.57)
nüchtern:			
5 mg/kg p.o.	24.7 (3.98)	5.5 (3.22)	30.3 (7.04)
10 p.o.	29.1 (7.50)	9.0 (4.53)	38.1 (11.64)

	Galle (% der Dosis)					
	Indo frei	Indo gesamt	DMI	DBI	DMBI	Gesamt
Futter:						
5 mg/kg p.o.	3.3 (1.27)	7.3 (4.02)	14.1 (6.16)	0.5 (0.32)	3.1 (1.77)	25.0 (5.99)
i.v.	11.8 (2.79)	19.2 (3.54)	14.4 (1.41)	1.4 (0.50)	3.1 (0.87)	38.0 (3.52)
10 mg/kg p.o.	3.9 (2.12)	7.2 (2.47)	7.7 (3.21)	0.4 (0.35)	0.7 (0.32)	15.9 (7.21)
i.v.	4.2 (2.17)	31.7 (7.86)	14.3 (3.10)	0.6 (0.20)	1.5 (0.53)	48.1 (9.46)
Gallerückf. *)	12.5 (3.52)	16.9 (4.54)	23.4 (4.52)	0.7 (0.42)	4.6 (1.12)	45.6 (9.71)
nüchtern:						
5 mg/kg p.o.	7.2 (2.81)	8.4 (2.10)	13.6 (5.25)	0.5 (0.10)	1.9 (0.61)	24.7 (3.98)
10 p.o.	1.1 (0.61)	14.7 (3.44)	13.6 (4.21)	0.4 (0.26)	0.5 (0.39)	29.2 (7.50)

*) Bezogen auf applizierte Gesamtmenge

Der Befund, daß im Rückführungsexperiment (n=3) im Mittel 92.2 % der in der applizierten Galle enthaltenen Gesamtmenge mit Galle und Harn eliminiert wurden, deutet darauf hin, daß annähernd die gesamte biliär eliminierte Fraktion reabsorbiert wird. Bei der Differenzierung des biliär eliminierten Anteils wurde neben dem Indometacin dem desmethylierten Metaboliten (DMI) besondere Beachtung beigemessen, da dieser nach BRUNE et al. (21) pharmakologische Wirksamkeit besitzt.

Hinsichtlich der biliären Indometacinausscheidung (freier Anteil + Phase II - Metaboliten) liegen die Verhältnisse ähnlich wie bei Ibuprofen (Tab. 3.10. und 3.11.).

Tab. 3.11. Ausscheidung von Indometacin (frei + Konjugate) mit der Galle in 24 Stunden (MW ± SD)

Dosis, Appl.	G_1 (0-4 Std)	G_2 (4-8 Std.)	G_3 (8-24 Std.)	Gesamt (0-24 Std.)
	(% der Dosis)			
Futter:				
5 mg/kg p.o.	1.2 (1.96)	1.6 (0.54)	4.5 (3.11)	7.3 (4.02)
i.v.	12.2 (3.79)	4.1 (0.75)	2.9 (0.86)	19.2 (3.54)
10 mg/kg p.o.	0.9 (0.53)	2.5 (1.94)	3.8 (1.82)	7.2 (2.47)
i.v.	20.4 (5.80)	6.7 (2.78)	4.6 (1.74)	31.7 (7.86)
Rückführung *)	6.0 (0.53)	13.3 (3.34)	11.3 (4.71)	30.7 (8.22)
nüchtern:				
5 mg/kg p.o.	3.7 (4.64)	1.9 (0.31)	2.8 (2.46)	8.4 (2.10)
10 p.o.	7.6 (3.68)	3.8 (1.17)	3.3 (0.77)	14.7 (3.44)

*) bezogen auf appl. Gesamtmenge

Nach oraler Gabe wurden nach beiden Dosierungen gleiche Fraktionen der Dosis (im Mittel 7.2 %; n = 6) in der Galle

gefunden, nach 5 mg/kg i.v. 19.2 % , nach 10 mg/kg i.v. 31.7 %. Der Anteil der Dosis, der nach Phase-I- Metabolisation als DMI biliär eliminiert wird, betrug in allen Versuchen ca. 14 %. Weitere Einzelheiten der Zusammensetzung der biliär eliminierten Fraktion sind aus Tab 3.10. und Abb. 3.11.) ersichtlich.

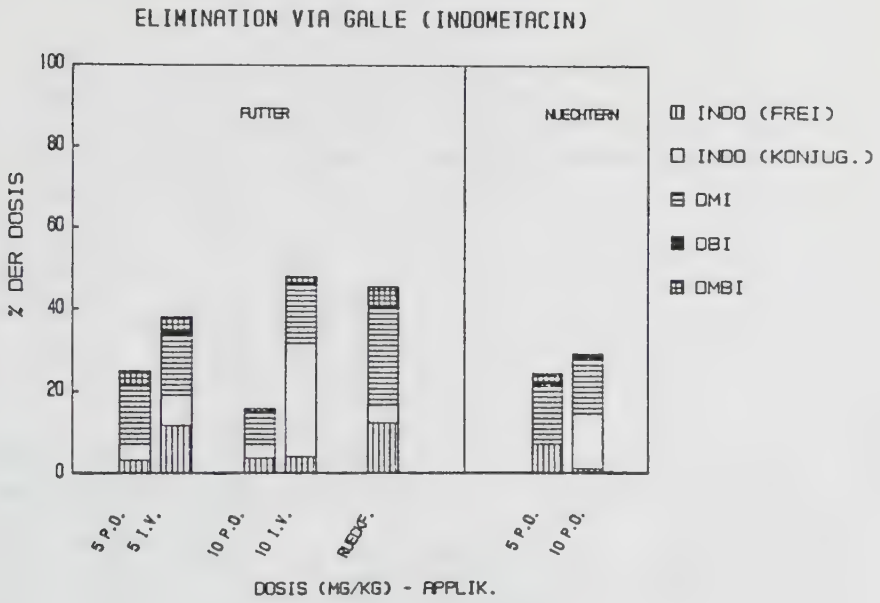


Abb. 3.11. Biliäre Elimination von Indometacin und Metaboliten über 24 Stunden

In Abb. 3.12. sind die Konzentrationszeitverläufe von Indometacin in der Galle dargestellt, d.h. der Anteil der Dosis, der pro Stunde unverändert eliminiert wird.

Nach p.o. Applikation bei normal gefütterten Ratten sind die Konzentrationszeitkurven bei beiden Dosierungen nahezu

identisch, d.h. der prozentuale Anteil, der pro Zeiteinheit biliär eliminiert wird, ist konstant. Bei nüchternen Tieren fällt auf, daß maximale Konzentrationen in der Galle früher erreicht werden und höher sind.

Nach i.v. Applikation tritt die Substanz erwartungsgemäß sehr rasch in der Galle auf. Nach der höheren Dosis (10 mg/kg) wird ein größerer Prozentsatz biliär als Indometacin eliminiert.

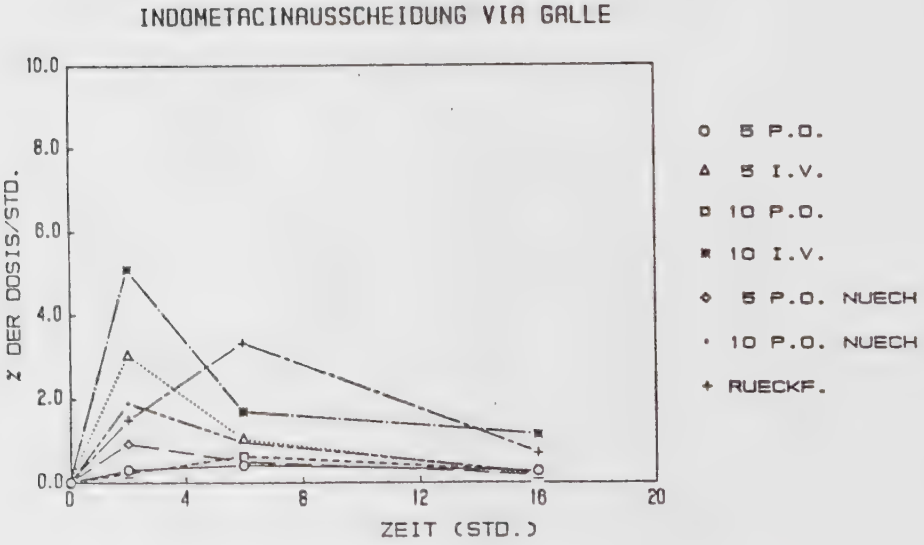


Abb. 3.12. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Indometacin in der Galle.

Der Kurvenverlauf nach i.d. Applikation arzneistoffhaltiger Galle ähnelt den Kurven nach oraler Applikation.

Der Anteil der Dosis, der unverändert in der Galle auftritt, ist jedoch wesentlich größer. Indometacin liegt also in der Galle in einer wesentlich besser resorbierbaren Form vor.

Im Harn der Tiere findet sich relativ wenig unverändertes Indometacin. Einzelheiten zur renalen Ausscheidung sind aus Tab. 6.3. und Abb. 6.7. im Anhang ersichtlich.

In Tab. 3.12. ist der Gallefluß, der pH-Wert der Galle sowie der Gehalt an Gesamtgallensäuren, Indometacin und DMI nach oraler Gabe von 5 bzw. 10 mg/kg Körpergewicht bei nüchternen und normal gefütterten Ratten gegenüber gestellt.

Tab 3.12. Gallefluß, Galle-pH und Gehalt der Galle an Gesamtgallensäuren und Indometacin bzw. DMI bei nüchternen und gefütterten Fistelratten nach oraler Gabe von Indometacin (MW ± SD)

Dosis (mg/kg)	Gallefluß (ml/(h*kg))	Gesamtgallensäuren (mcmol/kg)	pH	bil. Elimination Indo. (% der Dosis)	DMI	N
Futter						
5	2.32 (0.03)	520.9 (22.9)	8.50 (0.12)	7.3 (4.02)	14.1 (6.16)	4
10	2.18 (0.31)	425.7 (61.4)	8.49 (0.08)	7.2 (2.47)	7.7 (3.21)	6
Nüchtern						
5	2.42 (0.07)	524.5 (56.4)	8.40 (0.09)	8.4 (2.10)	13.6 (5.25)	3
10	2.24 (0.15)	453.7 (56.3)	8.46 (0.09)	14.7 (3.44)	13.6 (4.21)	4

Aus diesen Daten ergeben sich keine Hinweise, warum bei nüchternen Tieren keine intestinalen Ulzerationen auftreten. Im Gegenteil, der Gallefluß ist bei nüchternen Tieren verglichen mit gefütterten Tieren nach 5 mg/kg signifikant erhöht ($p<0.05$), ebenso wie die biliär eliminierte Indometacinmenge nach 10 mg/kg ($p<0.01$).

3.2.1.1.3. IBU-5-AS

Zum Eliminationsverhalten von IBU-5-AS bei der Ratte wurden orientierende Untersuchungen durchgeführt.
Dazu wurde eine Dosierung (41.4 mg/kg Körpergewicht entsprechend 25 mg/kg Ibuprofen) p.o. und i.v. appliziert.

Da keine Referenzsubstanzen der Phase-I-Metaboliten der Verbindung zur Verfügung standen, wurden Galle und Harn lediglich auf IBU-5-AS, Ibuprofen und deren Konjugate quantifiziert.

Im Harn der Tiere konnte nach alkalischer Hydrolyse in keinem Fall IBU-5-AS oder Ibuprofen nachgewiesen werden. Bei stark fluoreszierenden Verbindungen, die aufgrund der Retentionszeit wesentlich hydrophileren Charakter besitzen (Abb. 6.3. im Anhang), handelt es sich wahrscheinlich um Phase-I-Metaboliten der Substanz und um die zweite Komponente der Verbindung (5-Amino-salicylsäure).

Die Galle der Tiere enthielt nach oraler Applikation durchschnittlich 13.4 % der Dosis, nach i.v. Gabe im Mittel 15.9 % der Dosis als IBU-5-AS (Gesamtmenge nach Spaltung mit 1 N NaOH) sowie 9.5 bzw. 18.6 % als Ibuprofen (Tab. 3.13.).
Ein beträchtlicher Teil der applizierten Dosis wird also von der Ratte an der Säureamidbindung in die Ausgangskomponenten gespalten.

Tab. 3.13. Biliäre Elimination von IBU-5-AS und freigesetztem Ibuprofen bei den Fistelratten in 24 Stunden (MW ± SD)

Dosis, (mg/kg)	Appl.	IBU-5-AS (% der Dosis)	Ibuprofen
41.4	p.o.	13.4 (0.61)	9.5 (2.07)
	i.v.	15.9 (7.00)	18.6 (8.49)

3.2.2. Untersuchungen an weiteren Spezies

3.2.2.1. Elimination und enterohepatische Rezirkulation von Ibuprofen am Hund

3.2.2.1.1. Ibuprofen

Die Untersuchungen zur biliären Elimination von Ibuprofen wurden an zwei Mischlingshunden (R. und Tr.) durchgeführt. Plasma-, Galle- und Harnproben wurden über einen Zeitraum von 8 Stunden stündlich gewonnen.

Die pharmakokinetischen Parameter wurden nach einem offenen 2-Kompartment Modell (K22&U, Topfit, Fa. Thomae, Biberach/Riß) berechnet und sind im einzelnen, ebenso wie der biliär und renal eliminierte Anteil der Dosis, in Tab. 3.14. zusammengestellt.

Tab. 3.14a. Pharmakokinetische Parameter der Plasmakonzentrationsverläufe der Hunde nach intraduodenaler Gabe von 10 mg/kg KG Ibuprofen

Tier	Gewicht (kg)	Anpassungs-kriterium	lag-time (h)	c_{max} (mcg/ml)	t_{max} (h)	$t_{1/2\beta}$ (h)	V_D (l)	AUC (mcg*h/ml)	MTT (h)	Clearance (ml/min)	Modell
Tr.	11.4	1.995	0.52	26.3	0.60	1.63	3.88	56.32	2.31	33.74	K22&U
R.	8.4	1.996	0.95	22.2	1.59	1.23	2.57	62.59	2.10	30.36	K22&U
MW[*)]	9.9	1.994	0.61	18.5	1.37	1.24	2.67	58.04	2.26	28.43	K22&U

*) errechnete Werte basierend auf gemittelten Meßwerten aus beiden Versuchen

Tab. 3.14b. Biliäre und renale Elimination der Hunde (0-8 Std)

Tier	Galle Menge (ml)	IBU.	OH-IBU. (% der Dosis)	COOH-IBU.	Harn Menge (ml)	IBU.	OH-IBU. (% der Dosis)	COOH-IBU.
Tr.	54.0	22.8	3.24	3.80	24.5	1.26	7.41	5.65
R.	56.5	29.1	3.72	5.52	142.4	2.86	5.15	10.21

Die errechnete Plasmakonzentrationskurve aus den gemittelten Meßwerten ist in Abb. 3.13. dargestellt. Die Kurvenverläufe beider Tiere sind in Abb. 6.9. im Anhang angefügt.

Als Zeitpunkt t_{max} der maximalen Plasmakonzentrationen von 22.2 bzw. 26.3 mcg/ml wurden 0.60 bzw. 1.59 Stunden errechnet. Die terminale Plasmaeliminationshalbwertszeit $t_{1/2\beta}$ betrug 1.23 bzw 1.63 Stunden, die "Mean Transit Time" 2.31 bzw. 2.10 Stunden.
Mit der Galle schieden die Hunde in 8 Stunden 29.8 bzw. 38.3 % der Dosis aus, den Großteil als Ibuprofen und Konjugate (22.8 % bzw. 29.1 % der Dosis).

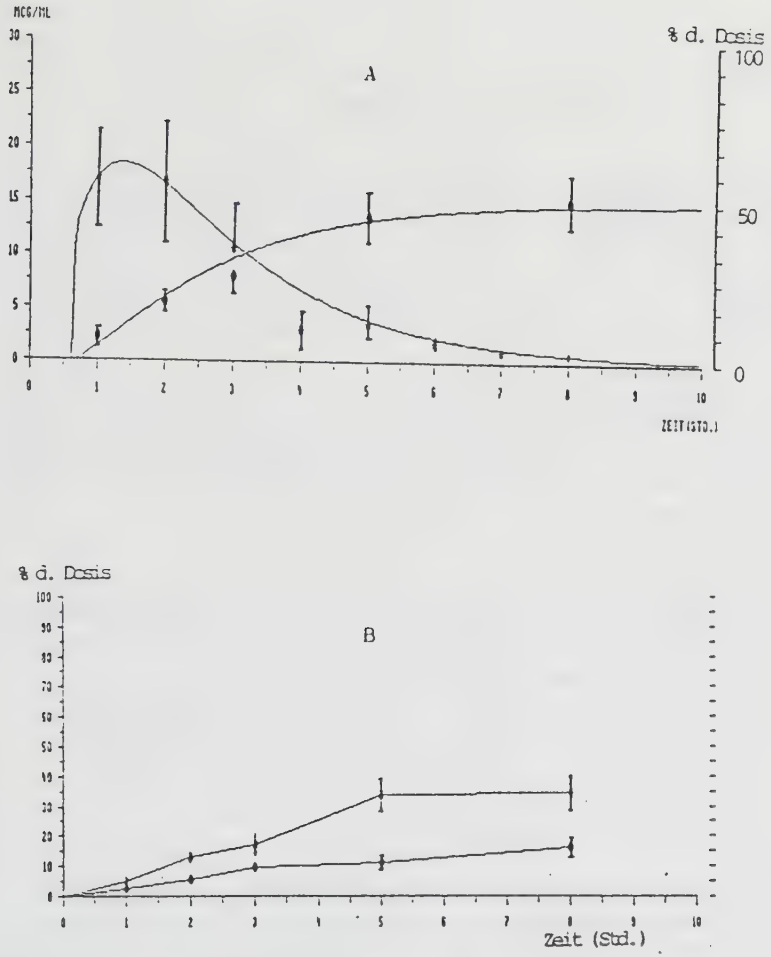


Abb. 3.13. Mittelwertskurven nach intraduodenaler Gabe von 10 mg/kg KG Ibuprofen bei zwei Hunden
A) Plasmakonzentrationsverlauf (*) und Gesamtelimination (Galle + Harn) (◆)
B) Biliär (*) und renal (◆) eliminierter Anteil der Dosis in 8 Std.

3.2.2.1.2. Elimination und enterohepatische Rezirkulation von Indometacin am Hund

Für die Versuche zur Ermittlung der biliären Elimination von Indometacin beim Hund konnten dieselben Tiere wie unter 3.2.2.1.1. herangezogen werden. Weiterhin war es möglich, mit jedem Hund zwei Versuche unter gleichen Bedingungen durchzuführen.

Zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter wurde wiederum das "Topfit" Programmpaket der Fa. Thomae, Biberach/Riß (Rechenmodell K22%U, entspricht einem offenen 2-Kompartment-Modell) verwendet.

Die errechneten Parameter der Einzelversuche sowie der Mittelwertskurve (nach Mittelung der Einzelmeßwerte aus 4 Versuchen) sind im einzelnen aus Tab. 3.15a. ersichtlich.

Die über 7 bzw. 8 Stunden renal bzw. biliär eliminierten Fraktionen der Dosis sind in Tab. 3.15b. zusammengefaßt.

Tab. 3.15a. Pharmakokinetische Parameter der Plasmakonzentrationsverläufe bei den Hunden (10mg/kg KG Indometacin i.d.)

Tier	Dosis (mg)	Anpassungs-kriterium	lag-time (h)	c_{max} (mcg/ml)	t_{max} (h)	$t_{1/2a}$ (h)	$t_{1/2\beta}$ (h)	V_D (l)	AUC (mcg*h/ml)	MTT (h)	Clearance (ml/min)
Tr.1	114	1.997	0.15	12.1	0.38	0.05	0.72	3.16	16.49	1.17	115.24
R.1	84	1.997	0.58	10.0	0.86	0.17	1.05	7.22	11.80	1.25	118.59
Tr.2	112	1.997	0.19	85.7	0.35	0.11	2.67	2.37	44.53	1.09	41.92
R.2	85	1.998	0.43	20.6	0.48	0.32	1.35	5.77	21.57	1.48	65.69
MW[*)]	98.8	1.999	0.30	14.8	0.58	0.18	2.03	8.66	18.03	1.84	91.35

*) errechnete Werte basierend auf gemittelten Megwerten aus den 4 Versuchen

Tab. 3.15b. Renale und biliäre Elimination (0-8 Std)

Tier	Galle Menge (ml)	Galle Indometacin (% der Dosis)	Galle DBI	Harn Menge (ml)	Harn Indometacin (% der Dosis)	Harn DBI
Tr.1	67.2	51.3	0.2	35.7	0.5	0.6
R. 1	44.0	70.9	0.5	34.1	1.0	1.0
Tr.2	51.5	45.2	0.3	57.3	1.6	0.9
R. 2	54.0	39.2	0.4	56.5	2.1	1.3
Gallerückführung						
Tr.	82.0	35.9	1.1	32.3	0.9	2.1
R.	68.6	32.0	1.9	53.9	1.1	3.9

Indometacin wird vom Hund, wie von anderen Autoren beschrieben (49, 68, 142), annähernd ausschließlich unverändert und konjugiert biliär ausgeschieden (39.2 - 70.9 % der Dosis in 8 Stunden).

Die gemittelte Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (n=4) sowie die gemittelte kumulative biliäre Elimination von Indometacin ist in Abb. 3.14A. dargestellt. Die graphische Darstellung der Einzelversuche findet sich in Abb. 6.10. im Anhang. Auf die Einbeziehung der renalen Elimination in die graphischen Abbildungen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit bewußt verzichtet.

Bei den gleichen Tieren war es möglich nach einer Wash-Out-Phase von einer Woche gepoolte Galle, die bei einem der o.a. Versuche gewonnen wurde, über einen Zeitraum von einigen Minuten intraduodenal zu infundieren.

Die Berechnung kinetischer Daten war nicht möglich, da kein für die besonderen Gegebenheiten (siehe Abb. 3.14B,C)

geeignetes Rechenmodell verfügbar war.

Wie aus Abb. 3.14.B und C ersichtlich, erfolgt die Resorption "in Schüben". Zunächst wird offensichtlich das in der Galle enthaltene freie, unkonjugierte Indometacin resorbiert. Der zweite Plasmapeak nach 4 - 5 Stunden wird wahrscheinlich durch einen zweiten Resorptionsschub nach Spaltung der in der Galle vorhandenen Konjugate hervorgerufen.

Auch nach Applikation arzneistoffhaltiger Galle wird im wesentlichen unverändertes Indometacin biliär eliminiert (32.0 bzw. 35.9 % der Dosis in 7 Stunden).

Aus diesen Daten läßt sich abschätzen, daß mindestens 50 % des biliär eliminierten Indometacins erneut zur Resorption gelangt.

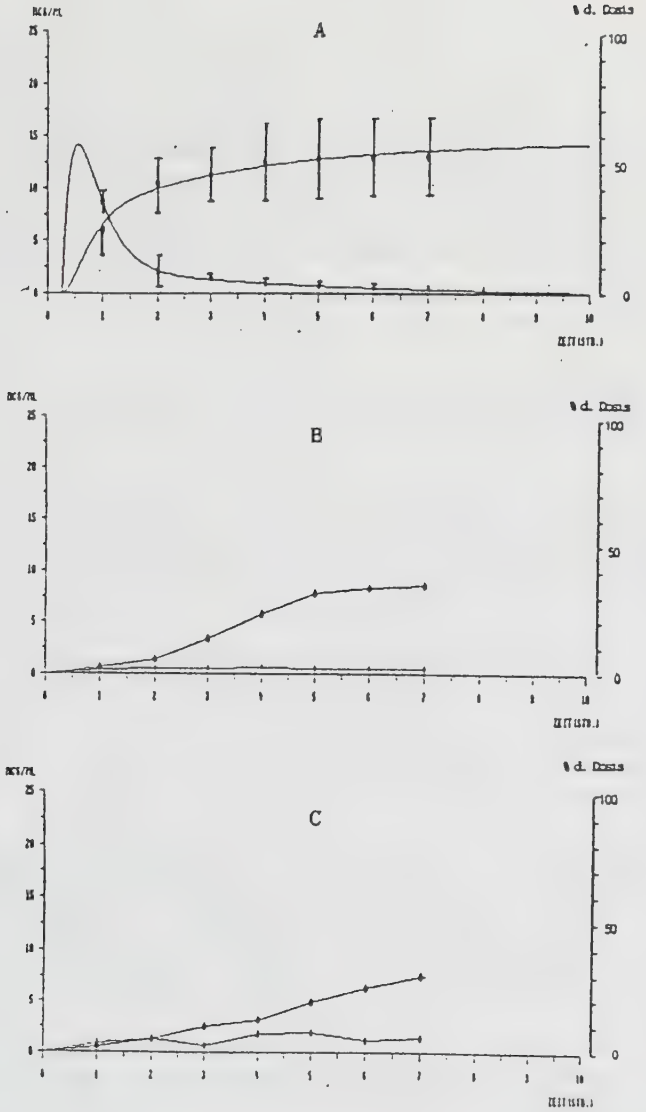


Abb. 3.14. Plasmaspiegel und biliäre Elimination beim Hund nach Gabe von Indometacin
A) Mittelwertsplasmakurve (*) und mittlere biliäre Indometacinelimination (*) nach i.d. Gabe von 10 mg/kg KG Indometacin (n=4)
B) Plasmaspiegel (*) und biliäre Elimination von Indometacin (*) bei Hund Tr. nach intraduodenaler Gabe arzneistoffhaltiger Galle
C) wie B) bei Hund R.

3.2.2.2. Biliäre und renale Elimination am Patienten

An drei weiblichen und einem männlichen Patienten konnte die biliäre und renale Elimination von Ibuprofen und Indometacin untersucht werden. In zwei Fällen ließ es der Allgemeinzustand der Patienten zu, zusätzlich Plasmaproben zur Ermittlung des Plasmakonzentrationsverlaufes von Ibuprofen zu gewinnen.

3.2.2.2.1. Ibuprofen

Aus den in Abb.6.11A. und.6.12A. im Anhang dargestellten Plasmaspiegelkurven geht hervor, daß die Resorption von Ibuprofen nach p.o. Gabe beim bettlägerigen Patienten starken Schwankungen unterliegen kann.

So wurde in einem Fall die maximale Plasmakonzentration von 30.1 mcg/ml bereits nach 0.4 Stunden erreicht, während im anderen Fall 2.3 Stunden bis zum Erreichen des Blutspiegelmaximums vergingen.

Die erreichten Plasmaspitzenkonzentrationen c_{max} (30.1 bzw. 35.2 mcg/ml), die terminale Plasmaeliminationshalbwertszeit $t_{1/2\beta}$ (1.6 bzw. 1.3 Stunden) sowie die "Mean Transit Time" (2.2 bzw. 3.6 Stunden) (Tab.3.16A.) liegen im Bereich gesunder Probanden (41,57).

Die renale Gesamtausscheidung (Ibuprofen + Metaboliten) lag bei den drei Patienten zwischen 85.0 und 90.2 % der Dosis (Tab.3.16B.).

Patient 2 schied in 24 Stunden insgesamt 1.4 % der Dosis biliär aus, 0.9 % der Dosis als Ibuprofen.
In der Galle von Patient 3 war weder Ibuprofen noch

Phase-II-Metaboliten nachweisbar.

Bei Patient 1 konnte nach 2 Stunden keine Galle mehr abgeleitet werden. Bis zu diesem Zeitpunkt traten 0.1 % der Dosis in der Galle auf. Da dieser Patient bereits nach 0.4 Stunden das Blutspiegelmaximum erreicht hatte, kann davon ausgegangen werden, daß insgesamt kaum mehr als 1 % der Dosis biliär eliminiert wurde.

Tab.3.16A. Pharmakokinetische Parameter der Plasmaspiegelkurven der Patienten nach p.o. Einnahme von 600 mg Ibuprofen in Form eines Handelspräparates

Pat.	Modell	AK	lag-time 1 (h)	lag-time 2 (h)	c_{max} (mcg/ml)	t_{max} (h)	$t_{1/2\beta}$ (h)	MTT (h)	V_D (l)	Cl. (ml/min)
1)	2k22	0.9997	0.22	1.30	30.1	0.44	1.63	2.21	12.8	148.1
2)	2k22	0.9943	0.32	1.71	35.2	2.32	1.30	3.56	8.9	79.3

Tab. 3.16B. Renale und biliäre Elimination der Patienten nach p.o. Applikation von 600 mg Ibuprofen bzw. 50 mg Indometacin

Pat.	Galle					Harn				
	Vol. (ml)	Mutter-substanz (% d. Dosis)	Gesamt 0-24 h	Gesamt 0-∞	lag-time (h)	Vol. (ml)	Mutter-substanz (% d. Dosis)	Gesamt 0-24h	Gesamt 0-∞	lag-time (h)
a) Ibuprofen:										
1)	38[a)]	0.09	-	-	-	655	10.5	85.0	85.0	2.16
2)	505	0.89	1.37	1.97	1.60	486	6.0	85.5	90.2	2.98
3)	260	-	-	-	-	765	10.9	87.5	87.8	2.50
b) Indometacin:										
4)	226	4.9	6.9	7.23	3.0	284	10.3	73.5	93.7	4.30

3.2.2.2.2. Indometacin

Die Patientin schied nach einer peroralen Dosis von 50 mg in 24 Stunden insgesamt 6.8 % der Dosis mit der Galle und 73.5 % der Dosis renal aus. 4.9 % der Dosis erschien in der Galle als Indometacin (inkl. Phase-I-Metaboliten).

4. DISKUSSION

Nach RAINSFORD (107) leiden bis zu 2.9 % der mit NSAIDs behandelten Rheumatikern an Ulzerationen des Magens und des Dünndarms. Wahrscheinlich liegt die wahre Inzidenz noch deutlich höher, da nur Patienten erfaßt werden konnten, die deutliche Symptome wie Blutungen, Malaena oder epigastrische Schmerzen zeigten und zur Abklärung der Ursache näher untersucht wurden.

Aus Tabelle 4.1. sind Inzidenzschätzungen der unerwünschten gastrointestinalen Wirkungen ausgewählter NSAIDs ersichtlich (nach 107).

Tab. 4.1. Inzidenz gastrointestinaler (GI) Nebenwirkungen ausgewählter nichtsteroidaler Antirheumatika(nach 107).

Substanz	unerwünschte GI - Wirkung				
	Ulzera	Übelkeit, Erbrechen	Dyspepsie	Schmerzen	Gesamt
		(% der Patienten)			
ASS	2.9	2.9-16.1*	7.1-24.0*	2.6-24.6*	22.0-49.2*
Diclofenac	0.3	3.4	4.5	4.5	12.3
Ibuprofen	0.8	1.8-9.1*	4.1-18.2*	6.8-7.2*	14.8-41.8*
Indometacin	2.1	10.6-12.1*	8.5	3.2	18.9-39.4*
Piroxicam	1.4	2.0	12.0	21.0	44.4
Sulindac	0.4	2.4	9.1	13.0	28.5

*) Angaben aus verschieden Studien z.T. mit verschiedenen Dosierungen

Im Falle des strukturell mit Indometacin verwandten Sulindacs, aus dem die wirksame Verbindung erst durch metabolische Umwandlung gebildet wird, fällt auf, daß die Nebenwirkungshäufigkeit im Vergleich zu Indometacin wesentlich niedriger liegt.

Die Überlegung, durch Kopplung von Ibuprofen mit 5-Amino-Salicylsäure ein Prodrug mit günstigerem gastrointestinalen Nebenwirkungsspektrum zu schaffen, liegt der Synthese von IBU-5-AS zugrunde. Als Bindungspartner für Ibuprofen wurde 5-Amino-Salicylsäure gewählt, da dieser Substanz für sich ein "disease modifying effect" bei rheumatischen Erkrankungen zugesprochen wird (91).

Außerdem könnte die Molekülverbindung selbst aufgrund ihrer Struktur eine antiinflammatorische Wirkung besitzen, da sie die nach BRUNE (32) erforderlichen Eigenschaften aufweist:

a) einen deutlichen Säurecharakter (pK_a = 4.5)
b) eine ausgeprägte Polarität des Moleküles mit einem hydrophilen und einem lipophilen Part

Zunächst mußte abgeklärt werden, ob die aufgrund der Struktur denkbare antiinflammatorische Wirksamkeit tatsächlich besteht.

1) In-vitro Hemmung der Freisetzung von PG E_2 aus Mausperitonealmakrophagen

Man weis heute, daß verschiedene Mediatoren am Entzündungsprozeß beteiligt sind, die sich gegenseitig sowohl in Bezug auf ihre Freisetzung als auch ihrer Wirkungen beeinflussen können. Neben Histamin, Bradykinin, Interleukin I und PAF spielen vor allem die 1932 von VON EULER entdeckten Prostaglandine sowie die Leukotriene eine wesentliche Rolle beim Entzündungsgeschehen (73,99,111).

Prostaglandin E_2, das in entzündeten Geweben in besonders hoher Konzentration auftritt, ist ein wirksamer Vasodila-

tator und trägt wesentlich zur Erythembildung, Wärmeerzeugung, Plasmaexsudation und Schwellung beim Entzündungsgeschehen bei. Außerdem führt PG E_2 zu einer Sensibilisierung der Schmerzrezeptoren gegenüber nocizeptiven Stimuli (31,99, 110).

Die reversible Hemmung der Cyclooxygenase, des Enzyms, das die Umwandlung der Arachidonsäure in Prostaglandine bewirkt, dürfte wesentlich für die Wirksamkeit der NSAIDs bei entzündlichen Erkrankungen sein (66,129,130).

Alle bekannten nichtsteroidalen Antirheumatika zeigen diese Hemmung der PG - Freisetzung auch in vitro. Deswegen dient z.B. die Beeinflussung des Arachidonsäurestoffwechsels von kultivierten Mausperitonealmakrophagen als aussagekräftiges Screening Modell zur Evaluierung der antiphlogistischen Potenz von Substanzen (20, 21, 24, 25).

IBU-5-AS erwies sich als guter Hemmstoff der Freisetzung von PG E_2. Die IC_{50}, d.h. die Konzentration, die 50 %ige Hemmung verursacht, liegt im Bereich anderer NSAIDs (Tab.4.2.).

Tab.4.2. IC_{50} - Werte von NSAIDs im Makrophagenassay

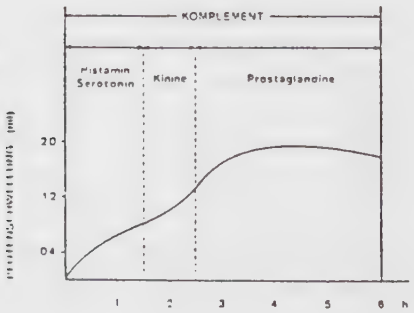
Substanz	IC_{50} Wert (Gemessen) (-log Mol/l)	IC_{50} Wert (Lit. 21) (-log Mol/l)
IBU-5-AS	4.48	-
Ibuprofen	5.92	6.26
5-ASA	3.09	-
Indometacin	7.89	8.77
ASS	-	5.18
Diclofenac	-	8.02
Diflunisal	-	5.85
Piroxicam	-	6.99
Sulindac	-	5.43

2. Wirkung beim Carrageenin-induzierten Rattenpfotenödem

Die antiinflammatorische Potenz einer Substanz bei akuten Entzündungen kann in vivo durch die Wirkung auf eine durch Applikation eines irritierenden Agens induzierte Schwellung untersucht werden.
Weit verbreitet ist als Screening Modell das Rattenpfotenödem. Dazu wird durch Injektion eines Irritans bevorzugt in die Hinterpfote ein ödem hervorgerufen, dessen Beeinflussung durch eine Substanz durch den zeitlichen Verlauf des Pfotenvolumens im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren verfolgt werden kann.
Zur Induktion des ödems können zahlreiche Substanzen herangezogen werden, z.B. Formalin, Dextran, Serotonin, Fremdeiweiß, Kaolin, Carrageenin, usw.).

Das von WINTER et al. eingeführte Carrageeninödem wird von allen NSAIDs dosisabhängig gehemmt - in halblogarithmischer Darstellung resultiert eine lineare Dosis-Wirkungs- Beziehung (99,128).

Abb. 4.1. Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufes des durch Carrageenin induzierten Pfotenödems und der Beteiligung der verschiedenen Entzündungsmediatoren (aus 74)



In Abb. 4.1. ist ersichtlich, welche Mediatoren im Verlauf des akuten ödems an der Entstehung der Symptome beteiligt sind.
Die antiinflammatorische Aktivität von NSAIDs ist besonders stark ausgeprägt, wenn die Schwellung das größte Ausmaß erreicht und pathophysiologisch die Wirkung der Prostaglandine im Vordergrund steht (1,74). Demgemäß dürfte die Fähigkeit der NSAIDs zur Hemmung der Freisetzung von Prostaglandinen einen wesentlichen Beitrag zur Wirkung der Substanzen bei akuten entzündlichen Prozessen leisten.

Die veröffentlichen Literaturdaten (21,84,99) zur Wirkpotenz verschiedener NSAIDs beim Carrageenin-ödem sind nur bedingt vergleichbar, da unterschiedliche Parameter (Rattenstamm, Carrageenin- Qualität, Auswertetechniken) differierende ED_{50} Werte ergeben können.

Tab. 4.3. ED_{50} Werte ausgewählter NSAIDs im Carrageenin-induzierten Rattenpfotenödem

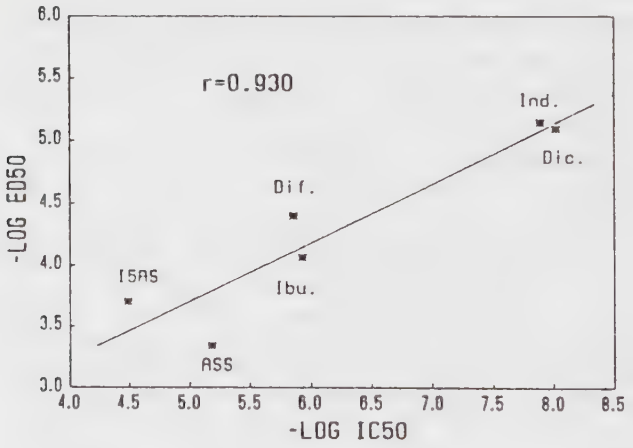
Substanz	ED_{50} Wert (Gemessen) (-log Mol/kg)	ED_{50} Wert (Literatur) (-log Mol/kg)
IBU-5-AS	3.70	-
Ibuprofen	4.06	3.94*
5-ASA	-	-
Indometacin	5.14	5.17*
ASS	-	3.33*
Diclofenac	-	5.09**
Diflunisal	-	4.39*
Sulindac	-	4.88*

*) aus Lit. (21)
**) aus Lit. (74)

Die für IBU-5-AS ermittelte ED_{50} im Carrageenin induzierten Rattenpfotenödem liegt im Bereich der relativ zu Indometacin und Diclofenac schwächer wirksamen Substanzen. Ein Teil der Wirkung von IBU-5-AS in vivo wird offensichtlich

durch das durch die Spaltung der Amidbindung freigesetzte Ibuprofen (siehe Kap. 3.2.1.1.3.) bewirkt.
Wie nicht anders zu erwarten, besteht eine recht gute Beziehung zwischen der in vitro Wirkung auf die PGE_2 Freisetzung und dem in vivo- Effekt im Rattenpfotenödem (Abb. 4.2.) (23).

Abb. 4.2. Korrelation zwischen IC_{50} im PG-Assay und ED_{50} beim Rattenpfotenödem (ASS=Acetylsalicylsäure, Dic=Diclofenac, Dif=Diflunisal, Ibu=Ibuprofen, Ind=Indometacin, I5AS=Ibu-5-AS)



Am häufigsten manifestieren sich unerwünschte Wirkungen nichtsteroidaler Antirheumatika unabhängig vom Applikationsweg am Gastrointestinaltrakt. Da fast alle NSAIDs diese Nebenwirkungen verursachen (mit Ausnahme der experimentellen Substanz BW755c (101)), sind auch diese Wirkungen zweifellos zumindest teilweise auf die lokale Hemmung der Prostaglandin Synthese in der Magen-Darm-Mukosa zurückzuführen, da PG E_2 und Prostacyclin die Durchblutung der Schleimhaut fördern, die Säure- und

Pepsinsekretion hemmen und die Mukusproduktion stimulieren (37,99,110,115,122). Durch die Störung der Mikrozirkulation kommt es zu lokaler Ischämie, was schließlich zu Nekrosen und Erosionen führen kann.

Bezüglich der Lokalisation Indometacin induzierter gastrointestinaler Ulzerationen unterscheiden sich die Beobachtungen verschiedener Autoren (18,48,115,137). Ursächlich dürfte der Einsatz verschiedener Rattenstämme und die Anwendung unterschiedlicher Bewertungskriterien sein.

Da wir vermuten, daß ein Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Potenz der untersuchten Substanzen zur Verursachung gastrointestinaler Läsionen und pharmakodynamischen, pharmakokinetischen bzw. physikochemischen Eigenschaften besteht, wurden die oben aufgeführten Ergebnisse unserer Untersuchungen (siehe Kap. 3.) unter diesem Gesichtspunkt betrachtet.

1. Korrelation zwischen gastraler Toxizität und Löslichkeit

Um vergleichende Betrachtungen durchführen zu können war es notwendig, die applizierten Dosen aufgrund der unterschiedlichen pharmakologischen Potenz der Wirkstoffe zu relativieren. Es wurden Quotienten Th_I und Th_{II} ("Therapeutische Indices") aus applizierter Dosis und ED_{50} im Rattenpfotenödem bzw. IC_{50} im in-vitro Prostaglandinassay gebildet (siehe Tab. 4.4. und 4.5.).
Zusätzlich wurde die Löslichkeit der Substanzen in sauren wässrigen Medien in die Überlegungen einbezogen, indem Th_{II} mit der Basallöslichkeit (BL) der Substanzen multipliziert wurde.

$Th_I = D/ED_{50}$

$Th_{II} = D/IC_{50}$ (l/kg)

$Th_{IIa} = (D/IC_{50}) * BL$ (Mol/kg)

TH_I, Th_{II}, Th_{IIa} : Therapeutische Indices

D : Dosis (Mol/kg)

ED_{50} : Dosis, die im Rattenpfotenödem 50 %ige Hemmung der Schwellung bewirkt (Mol/kg)

IC_{50} : Konzentration, die die PG-Freisetzung in vitro zu 50 % hemmt (Mol/l)

BL : Basallöslichkeit, Löslichkeit in Wasser bei pH 2 und Raumtemperatur (Mol/l).

Diese Quotienten wurden mit der in Kap. 3.1.3. ermittelten Ulkuszahl korreliert (Tab. 4.5.).

Tab. 4.4. Pharmakologische und physikochemische Daten der untersuchten Substanzen

Substanz	pk_a	IC_{50} a)	ED_{50} b)	Löslichkeit c) bei				
				pH2	pH3	pH4	pH5	pH6
		(10^{-6}M)	(10^{-6}Mol/kg)	(10^{-6} Mol/100ml)				
Indometacin	4.6	0.013	7.3	0.84	0.86	1.05	2.95	21.94
Ibuprofen	4.5	1.2	87.0	10.71	11.02	14.06	44.45	348.40
IBU-S-AS	4.5	33.0	200.0	1.21	1.24	1.58	5.00	39.22

a) Konzentration, die die PG-Freisetzung in-vitro zu 50 % hemmt

b) Konzentration, die beim Rattenpfotenödem 50 %ige Hemmung bewirkt

c) errechnet nach $c_{ges} = c_{HA} * (1 + 10^{pH-pK_a})$ c_{HA} = Basallöslichkeit

Tab. 4.5.: Korrelation zwischen Ulkuszahl und Dosis bei nüchternen und gefütterten Ratten

Substanz	Dosis (mg/kg)	Dosis (10^{-6}Mol/kg)	Ulkuszahl Futter	Ulkuszahl nüchtern	D/ED_{50}*)	D/IC_{50}*) (l/kg)	D/IC_{50}*)•BL**) (10^{-5}Mol/kg)
Indo.	5	14.0	4.2	0.2	1.92	1076.9	904.6
Indo.	10	27.9	2.3	3.3	3.84	2146.2	1802.8
Indo.	16	44.7	20.2	6.7	6.14	3438.5	2888.3
Ibuprofen	25	121.4	0.0	0.0	1.39	101.2	1080.8
Ibuprofen	100	485.4	3.9	3.1	5.56	404.5	4320.1
Ibuprofen	300	1456.3	14.1	16.1	16.69	1213.6	12961.2
IBU-S-AS	41.4	121.4	0.1	0.1	0.61	3.7	4.4
IBU-S-AS	496.5	1456.3	0.1	0.1	7.26	44.1	52.9
Korr.: Futter				(n=8)	r: 0.575	0.789[a]	0.584[a]
		Indo.		(n=3)	0.843	0.844	
		Ibu.		(n=3)	1.000	1.000	
	Nüchtern:			(n=8)	r: 0.904[b]	0.423	0.956[b]
		Indo.		(n=3)	1.000	1.000	
		Ibu.		(n=3)	0.996	0.996	

*) aus Tab. 4.4.

**)BL = Basallöslichkeit (Löslichkeit in stark sauren wässrigen Medien)

a = $p < 0.05$

b = $p < 0.01$

a) Nüchterne Tiere

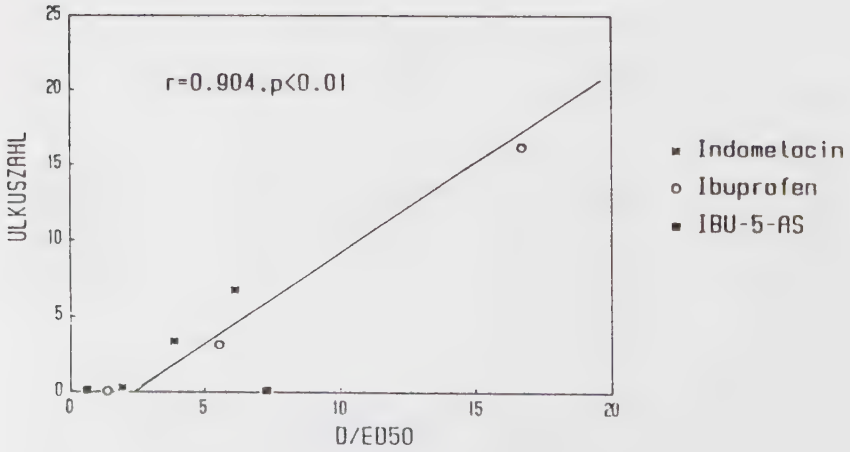
Wie aus Tabelle 4.5. zu ersehen ist, besteht ein signifikanter Zusammenhang ($p<0.01$) zwischen dem "therapeutischen Index" aus Dosis und ED_{50} im Rattenpfotenödem und der Ulkuszahl ($r= 0.904$) (Abb.4.3.).

$$y = 0.97 * x - 1.59$$

$x = D/ED_{50}$; y = Ulkuszahl

Auffällig ist, daß die für die hohe Dosis von IBU-5-AS (496.5 mg/kg) experimentell ermittelte Ulkuszahl deutlich vom erwarteten Wert abweicht. Der Grund hierfür liegt

Abb. 4.3. Korrelation zwischen "Therapeutischem Index" aus Dosis und ED50 und der Ulkuszahl bei nüchternen Ratten



eindeutig in der relativ geringen Löslichkeit der Substanz bei sauren pH-Werten.
Bei Wiederholung des Versuches fanden wir nach Applikation einer Lösung des Natriumsalzes eine Ulkuszahl von 6.60 ± 3.78.

Berücksichtigt man die PG-Synthesehemmung, indem man den Quotienten aus Dosis und IC50 bildet, fällt zunächst keine signifikante Beziehung zur Ulkuszahl auf (r=0.423) (Tab. 4.5.).

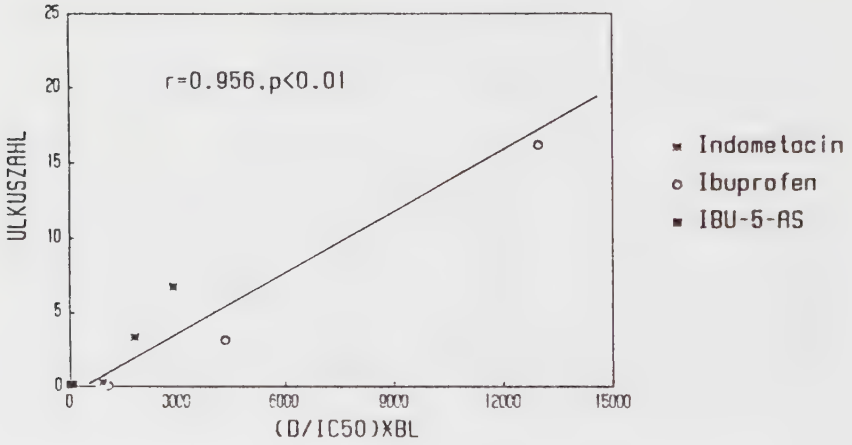
Bezieht man die Löslichkeit der Substanzen in sauren wässrigen Medien (Basallöslichkeit) in die Überlegungen ein, indem man diesen Index mit der Basallöslichkeit der Substanz multipliziert, resultiert ein hochsignifikanter Zusammenhang (r=0.956, $p < 0.01$) (Tab. 4.5. und Abb. 4.4.).

$$y = 0.001 * x - 0.033$$

$$x = D * BL / IC_{50}; \qquad y = \text{Ulkuszahl}$$

Innerhalb der einzelnen Substanzgruppen (Indometacin bzw. Ibuprofen) ergibt sich eine eindeutige Dosis-Wirkungs-beziehung (Tab. 4.5.).

Abb. 4.4. Korrelation zwischen "Therapeutischem Index" aus Dosis und IC_{50} und der Ulkuszahl bei nüchternen Ratten unter Berücksichtigung der Basallöslichkeit



b) Normal gefütterte Tiere

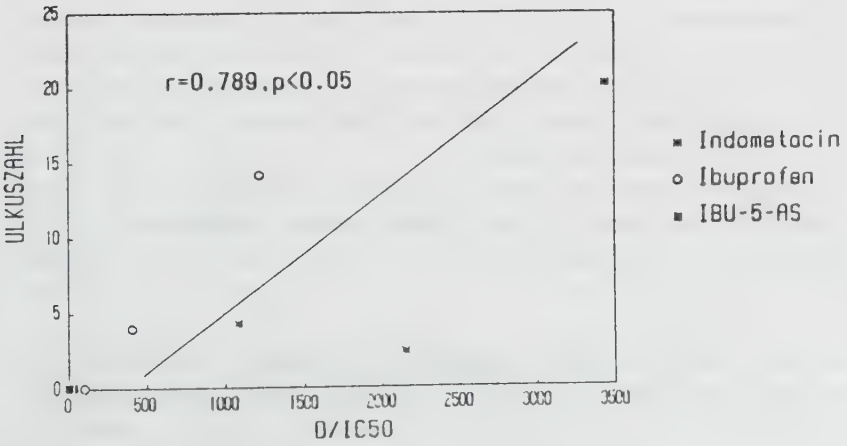
Überträgt man die unter a) formulierten Überlegungen auf die bei normal gefütterten Tieren ermittelten gastralen Toxizitätsdaten (Tab. 4.4.), so läßt sich bei Verwendung der ED_{50} für die untersuchten Substanzen kein signifikanter Zusammenhang zwischen Dosis und Ulkuszahl erkennen. Bei Verwendung der IC_{50} ergibt sich eine signifikante Beziehung ($r=0.789$, $p<0.05$) (Abb. 4.5.).

$$y = 0.005 * x + 0.495$$

$x = D/IC_{50}$; y = Ulkuszahl

Innerhalb der Ibuprofengruppe besteht offensichtlich eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung (Tab. 4.5.).

Abb. 4.5. Korrelation zwischen "Therapeutischem Index" aus Dosis und IC_{50} und der Ulkuszahl bei gefütterten Ratten



Die Hypothese, daß die Beeinflussung der PG-Konzentration ein wesentlicher Aspekt für die Entstehung gastrointestinaler Läsionen darstellt, wird durch den Befund gestützt, daß der ulzerogene Effekt von Indometacin durch gleichzeitige Gabe von Prostaglandinen oder Prostaglandinanalogen aufgehoben werden konnte (115).

2. Korrelation zwischen intestinaler Toxizität und biliärer Elimination

Zur Überprüfung unserer formulierten Hypothese, daß das Ausmaß der von einer Substanz ausgelösten intestinalen Ulzerationen wesentlich durch das biliäre Eliminationsverhalten bestimmt wird , wurde versucht, eine Beziehung zwischen biliär eliminierter Menge von Muttersubstanz und wirksamen Metaboliten und dem Prozentsatz intestinaler Ulzerationen aufzustellen.

Dazu war es wie unter 1. beschrieben wiederum notwendig, einen Quotienten einzuführen, d.h. die unterschiedliche pharmakologische Wirkpotenz - oder in diesem Falle Nebenwirkungspotenz - der Substanzen zu berücksichtigen. Einerseits wurde der Quotient aus der biliär eliminierten Menge und der ED_{50} im Rattenpfotenödem und andererseits der Quotient aus der biliär eliminierten Menge und IC_{50} im in-vitro PG-Assay gebildet.
Weiterhin wurden die pharmakologisch aktiven biliär eliminierten Metaboliten in die Überlegungen einbezogen - im Falle des Indometacins das DMI (21), bei IBU-5-AS das freigesetzte Ibuprofen.

In Tab. 4.6. sind die intestinale Toxizität, die ED_{50} im Rattenpfotenödem, die IC_{50} im PG-Assay sowie die biliär

Tab. 4.6. Intestinale Ulzerationen und biliär eliminierte Menge von Muttersubstanz und wirksamen Metaboliten nach oraler Gabe an gefütterte Ratten

Substanz	Dosis (mg/kg)	Dosis (10^{-6}M)	Intest. Ulz.(%)	ED_{50} [a] (10^{-6} Mol/kg)	IC_{50} [b] (10^{-6} Mol/l)	biliär eliminierte Menge: Muttersubstanz (mg/kg)	Muttersubstanz (10^{-6}Mol/kg)	Hauptmetabolit (mg/kg)	Hauptmetabolit (10^{-6}Mol/kg)
						Indo.			DMI[*]
Indo.	5	14.0	1.4	7.3	0.013	0.37	1.03	0.68	1.97
	10	27.9	23.2			0.72	2.01	0.74	2.15
	16	44.7	46.2						
Ibu.	25	121.4	0.1	87.0	1.2	3.85	18.69		
	100	485.4	5.2			16.80	81.61		
	300	1456.3	29.2						
						Ibu-5-AS		Ibuprofen	
Ibu5-AS	41.4	121.4	0.0	200.0	33.0	5.54	16.11	2.50	12.14
	496.5	1456.3	0.4						
[*] DMI (aus BRUNE et al. (21))				144.5	0.083				

a) Konzentration, die beim Rattenpfotenödem 50 %ige Hemmung bewirkt
b) Konzentration, die die PG-Freisetzung in-vitro um 50 % hemmt

eliminierten Mengen von Muttersubstanz und Hauptmetabolit nach p.o. Gabe bei gefütterten Tieren zusammengestellt.

Vergleicht man den Quotienten aus Dosis und ED_{50} im Rattenpfotenödem mit dem Ausmaß intestinaler Ulzerationen (Tab. 4.7.), läßt sich kein signifikanter Zusammenhang nachweisen ($r=0.076$; $n=5$).

Da verschiedene Autoren vermuten, daß die PG-Hemmung in der Darmmukosa ausschlaggebend für die intestinalen Nebenwirkungen nichtsteroidaler Antirheumatika sein könnte

(37,115), erscheint es angebracht, die IC_{50} Werte der untersuchten Substanzen in die Überlegungen einzubeziehen.

Bei Korrelation des Quotienten aus der biliär eliminierten Menge und IC_{50} und dem Prozentsatz intestinaler Ulzerationen (Tab. 4.7., Abb. 4.6.) ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang ($p<0.05$, $r=0.879$).

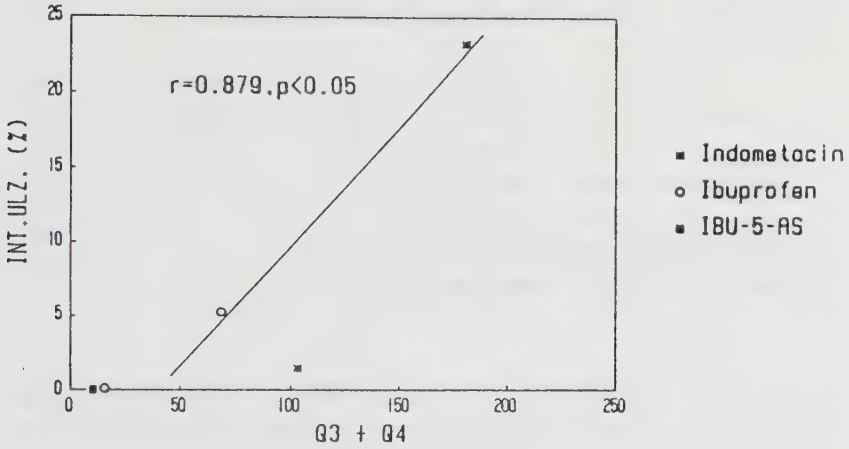
Tab. 4.7. Quotienten aus biliär eliminierter Menge von Muttersubstanz und pharmakologisch aktiven Metaboliten und ED_{50} bzw. IC_{50} und Prozentsatz intestinaler Ulzerationen bei gefütterten Ratten

	Dosis (mg/kg)	Q_I [a]	Q_{II} [b]	Q_I+Q_{II}	int.Ulz. (%)
Indo.	5	0.141	0.014	0.155	1.4
	10	0.275	0.015	0.290	23.2
Ibu.	25	0.215	-	0.215	0.1
	100	0.938	-	0.938	5.2
I-5-AS	41.4	0.080	0.140	0.220	0.0
				r = 0.076	

	Dosis (mg/kg)	Q_{III} [c] (l/kg)	Q_{IV} [d] (l/kg)	$Q_{III}+Q_{IV}$ (l/kg)	int.Ulz. (%)
Indo.	5	79.23	23.73	102.96	1.4
	10	154.62	25.90	180.52	23.2
Ibu.	25	15.58	-	15.58	0.1
	100	68.00	-	68.00	5.2
I-5-AS	41.4	0.49	10.12	10.61	0.0
				r = 0.879	

a) Q_I = biliär elim.Menge/ED_{50} Muttersubstanz
b) Q_{II} = " aktiver Hauptmetabolit
c) Q_{III} = biliär elim.Menge/IC_{50} Muttersubstanz
d) Q_{IV} = " aktiver Hauptmetabolit

Abb. 4.6. Korrelation zwischen dem Quotienten aus biliär eliminierter Menge und IC_{50} und dem Prozentsatz intestinaler Ulzerationen bei gefütterten Ratten



Die bisher angestellten Überlegungen berücksichtigten nur den biliär eliminierten Anteil der applizierten Dosis. Da - wie in den Gallerückführungsexperimenten gezeigt - ein beträchtlicher Teil der in der Galle enthaltenen Substanz reabsorbiert werden kann, sollte unter Berücksichtigung der enterohepatischen Rezirkulation die Substanzmenge betrachtet werden, mit der die Darmmukosa direkt konfrontiert wird.

Aus den durchgeführten Rezirkulationsexperimenten konnte ermittelt werden, daß von den mit der Galle eliminierten Substanzen 30.6 % (Indometacin), 58.7 % (DMI) bzw. 21.6 %

(Ibuprofen) rezirkulieren können, d.h. nach Resorption erneut in der Galle auftauchen.
Die Gesamtmenge, mit der die Darmmukosa in Kontakt kommt, läßt sich unter der Voraussetzung, daß im Magen relativ wenig der applizierten Menge resorbiert und im Darm anschließend fast vollständige Resorption erfolgt, näherungsweise nach folgender Formel berechnen:

$$M = D + M_E * (M_R^0 + M_R^1 + M_R^2 + ... + M_R^n)$$

M = Gesamtmenge (mg)
D = Dosis (mg)
M_E = biliär eliminierte Menge (mg)
M_R = rezirkulierender Anteil (%)

Setzt man in diese Gleichung die für Indometacin und Ibuprofen gewonnenen Daten ein, so ergibt sich (z.B. für n=20):

25 mg/kg Ibuprofen:

$$M = 25.0 + 3.85 * (0.216^0 + 0.216^1 + ... + 0.216^n) =$$
$$= 29.9 \text{ mg } (= 145.2 * 10^{-6} \text{ Mol})$$

100 mg/kg Ibuprofen:

$$M = 100.0 + 16.80 * (0.216^0 + 0.216^1 + ...+ 0.216^n) =$$
$$= 121.4 \text{ mg } (= 589.5 * 10^{-6} \text{ Mol})$$

5 mg/kg Indometacin:

$$M = 5.0 + 0.37 * (0.306^0 + 0.306^1 + ... + 0.306^n) =$$
$$= 5.53 \text{ mg } (= 15.56 * 10^{-6} \text{ Mol})$$

$$DMI: \quad M = 0.68 * (0.587^0 + 0.587^1 + ... + 0.587^n) = 1.65 \text{ mg } (= 4.79 * 10^{-6} \text{ Mol})$$

10 mg/kg Indometacin:

$$M = 10.0 + 0.72 * (0.306^0 + 0.306^1 + ... + 0.306^n) =$$
$$= 11.04 \text{ mg } (= 30.83 * 10^{-6} \text{ Mol})$$

$$DMI: \quad M = 0.74 * (0.587^0 + 0.587^1 + ... + 0.587^n) = 1.79 \text{ mg } (= 5.21 * 10^{-6} \text{ Mol})$$

Bildet man wie oben beschrieben die Quotienten aus Gesamtmenge M und der ED_{50} im Rattenpfotenödem bzw. aus Gesamtmenge M und der IC_{50} im in-vitro PG-Assay und setzt diese in Korrelation zum Prozentsatz intestinaler Ulzerationen, ergibt sich im zweiten Falle ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang ($r=0.873$, $p<0.05$) (Tab. 4.8. und Abb. 4.7.).

In der Literatur finden sich zahlreiche Untersuchungen zur gastrointestinalen Toxizität von Indometacin:

Die gastrotoxische Wirkung von Indometacin läßt sich nach SHEN und WINTER (115) nicht auf eine gesteigerte Säureproduktion zurückführen.

BRODIE et al. (18) konnten durch Indometacin verursachte intestinale Läsionen weder durch anticholinerge Pharmaka,

Tab. 4.8. Zusammenhang zwischen intestinalen Toxizität und biliär eliminierter Substanzmenge unter Berücksichtigung des rezirkulierenden Anteils nach oraler Applikation bei gefütterten Ratten

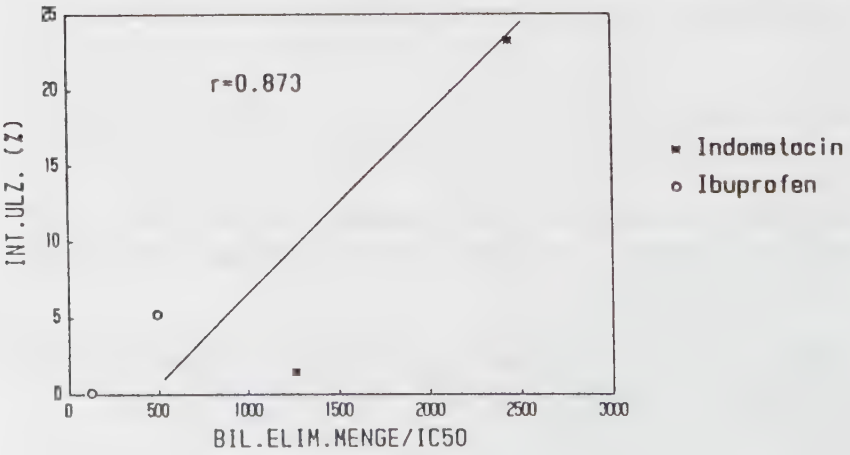
Substanz,	Dos. (mg/kg)	Gesamtmenge (µmol/kg) Muttersubstanz	DMI	Gesamtmenge/ED_{50} Muttersubstanz	DMI	Summe	int. Ulzerationen (%)
Indo.	5	15.56	4.79	2.13	0.03	2.16	1.4
	10	30.84	5.21	4.22	0.04	4.26	23.2
Ibu.	25	145.24		1.67		1.67	0.1
	100	589.49		6.78		6.78	5.2

r: 0.395 (n=4)

Substanz,	Dos. (mg/kg)	Gesamtmenge (µmol/kg) Muttersubstanz	DMI	Gesamtmenge/IC_{50} (l/kg) Muttersubstanz	DMI	Summe	int. Ulzerationen (%)
Indo.	5	15.56	4.79	1196.9	52.7	1254.6	1.4
	10	30.84	5.21	2372.3	62.8	2435.1	23.2
Ibu.	25	145.24		121.0		121.0	0.1
	100	589.49		491.2		491.2	5.2

r: 0.873 (n=4)

Abb. 4.7. Korrelation zwischen dem Quotienten aus der Substanzmenge, mit der die Darmmukosa konfrontiert wird, (unter Berücksichtigung des enterohepatisch rezirkulierenden Anteils) und der IC_{50} und dem Prozentsatz intestinaler Ulzerationen bei gefütterten Ratten



Cyproheptadin, Pentobarbital, Chlorpromazin noch Aluminiumhydroxid beeinflussen. Durch Gabe von 2 g/kg Cholestyramin war es möglich, die Ulkusinzidenz von 100 % auf 30 % zu reduzieren, wahrscheinlich durch Reduktion der nach biliärer Elimination im Darm befindlichen Menge und Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufs.

Nach DEL SOLDATO et al. (43) kann durch Behandlung mit Salicylazosulfapyridin oder Dexamethason die Inzidenz intestinaler Ulzerationen verringert werden.

Weiterhin läßt sich die ulzerogene Wirkung von Indometacin durch orale Gabe von Antibiotika wie Neomycin, Polymycin B oder Bacitracin aufheben (115). Es könnte demzufolge sein, daß die Bakterienflora des Darmes eine wichtige Rolle bei der Ulkusentstehung nach initialen Läsionen spielt oder daß die Spaltung der biliär eliminierten Konjugate unterbleibt und eine Reabsorption daher nicht möglich ist.

Durch Futterentzug läßt sich die ulzerogene Wirkung von Indometacin bei Ratten aufheben. Nach BRODIE et al. (18) muß das Futter nur am Tag der Substanzgabe entzogen werden um kompletten Schutz zu erreichen.

Für die ulzerogene Wirkung scheint ein intakter Gallefluß erforderlich zu sein. Durch Unterbinden des Galleganges läßt sich die Entstehung von Ulzera auch bei gefütterten Tieren vollständig vermeiden (18).
Durch das Einleiten arzneistoffhaltiger Galle in das Duodenum eines Receiver-Tieres konnten Ulzerationen erzeugt werden (115).
Andererseits war es nicht möglich, durch Gabe eines Choleretikums (1-Phenylpropanol) die ulzerogene Wirkung von Indometacin zu steigern (42).

Wir konnten in unserem Versuchsmodell lediglich nach der

hohen Dosis von 100 mg/kg Ibuprofen sowohl nach i.g. als auch nach i.v. Applikation eine signifikante Zunahme ($p<0.05$) des Galleflusses feststellen, die nach der Rückführung ibuprofenhaltiger Galle noch deutlicher ausfiel ($p<0.01$). Ursächlich hierfür dürften vor allem osmotische Effekte und im Falle der Rückführung das zugeführte Flüssigkeitsvolumen und die enthaltenen Gallensäuren sein.

Es konnte gezeigt werden, daß an isolierten Darmabschnitten (Thiry-Vella Loops) mit intakter Innervierung und systemischer Blutversorgung keine Läsionen auftraten (18). Die systemische Wirkung von Indometacin kann also nicht allein für die Entstehung von Ulzerationen verantwortlich sein.

Die Zusammensetzung des Futters scheint für die intestinotoxische Wirkung von Indometacin von wesentlicher Bedeutung zu sein.
Durch Verfütterung einer fettfreien Diät konnte das Ausmaß der ulzerogenen Wirkung wesentlich reduziert werden (115).

Außerdem ist der Anteil von Balaststoffen im Futter entscheidend. Nach DREES et al. (48) konnte ein mit dem Fasten vergleichbarer Effekt durch das Verfüttern einer balaststoffarmen Diät erreicht werden. Die Gesamtfuttermenge war nicht ausschlaggebend. Es scheint eine Korrelation zu bestehen zwischen der im Gastrointestinaltrakt befindlichen Futtermenge und der Inzidenz intestinaler Läsionen, möglicherweise durch eine Beeinflussung des enterohepatischen Kreislaufes von Indometacin.

Die in Kapitel 3.1.3. dargestellten Ergebnisse der Versuche zur gastrointestinalen Ulzerogenität der untersuchten Substanzen bei der Ratte stehen in Einklang mit den o.a. Beobachtungen anderer Autoren.
Das Ausmaß der gastralen Toxizität ist innerhalb der ein-

zelnen Substanzgruppen dosisabhängig. IBU-5-AS erwies sich als besonders gut verträglich. Ursächlich dafür könnte die relativ geringe pharmakologische Wirkpotenz und die schlechte Löslichkeit in wässrigen sauren Medien sein.

Wie oben ausgeführt, ergibt sich nach Einführung eines "Therapeutischen Index" aus Dosis und ED_{50} im Rattenpfotenödem bzw. IC_{50} im in-vitro PG-Assay eine lineare Beziehung zwischen der Dosis und dem Ausmaß der gastralen Läsionen.
Bei gefütterten Tieren ist es nicht ohne weiteres möglich, eine für alle drei Substanzen allgemein gültige Beziehung zu erstellen. Offensichtlich ist der Einfluß des Futters auf das Resorptionsverhalten der verschiedenen Substanzen unterschiedlich ausgeprägt.
Bei nüchternen Tieren wird besonders offensichtlich, daß die Löslichkeit einer Substanz in sauren wässrigen Medien von entscheidender Bedeutung für die Entstehung gastraler Ulzerationen ist. Unter Berücksichtigung der Basallöslichkeit ergibt sich ein hochsignifikanter Zusammenhang ($n=8$, $r=0.956$, $p<0.01$).
Die relativ hohen Standardabweichungen bei der Ermittlung der Ulkuszahl (Tab. 3.5. und 3.6.) könnte durch eine erhöhte Streßempfindlichkeit einzelner Tiere oder durch einen duodenogastralen Reflux von gallesäurehaltigem Darminhalt bei diesen Tieren zustande kommen.

Wie in oben ausgeführt konnte bei gefütterten Ratten unter Berücksichtigung der pharmakologischen Potenz der Substanzen im in-vitro PG-Assay eine lineare Beziehung zwischen biliär eliminierter Menge und dem Prozentsatz intestinaler Ulzerationen aufgestellt werden ($n=5$, $r=0.879$, $p<0.05$). Die durch 5 mg/kg Indometacin verursachten intestinalen Läsionen sind nicht so schwerwiegend, wie aufgrund der aufgestellten Beziehung zu erwarten wäre. Die Ursache könnte neben der bereits von YESAIR et al. (141) beschrie-

benen schlechten Bioverfügbarkeit von Indometacin bei der Ratte nach oraler Gabe eine dosisabhängig geringere enterohepatische Rezirkulation sein.

Wie aufgrund der Berichte anderer Autoren (s.o.) nicht anders zu erwarten, entwickelten nüchterne Ratten kaum intestinale Ulzerationen. Die Ursache für die enormen Unterschiede zu normal gefütterten Tieren konnte durch die untersuchten Parameter nicht erklärt werden. Es konnten keine Unterschiede zwischen nüchternen und gefütterten Tieren nach oraler Gabe von 5 bzw 10 mg/kg Indometacin hinsichtlich des Galleflusses, des pH-Wertes der Galle, des Gehaltes an Gesamtgallensäuren sowie der biliär eliminierten Menge von Indometacin und DMI festgestellt werden.

über die Ursachen dieses Unterschiedes kann an dieser Stelle nur spekuliert werden:

- Da die Zusammensetzung des Futters (besonders der Gehalt an Fetten und Balaststoffen) von entscheidender Bedeutung für die Entstehung intestinaler Ulzera ist, könnte es sein, daß die biliär eliminierte Substanz in einer Form vorliegt, die nicht erneut zur Resorption gelangen kann.

- Die durch die PG-Hemmung verursachte Beeinträchtigung der Mikrozirkulation könnte durch eine starke mechanische Dehnung der Darmwand bedingt durch vorhandene Nahrungsreste verstärkt werden.

- Die o.a. Übereinstimmung der untersuchten Parameter bei gefütterten und nüchternen Ratten könnte durch eine operationsbedingte Beeinflussung des vegetativen Nervensystems zustande kommen.

- Untersuchungen von HUCKER et al. (68) und YESAIR et al. (142) zur Pharmakokinetik von Indometacin bei nüchternen und gefasteten Ratten (siehe unten) lassen den Schluß zu, daß sich die Galle bei nicht operierten Tieren im nüchternen bzw. gefütterten Zustand hinsichtlich der Zusammensetzung und des Indometacingehaltes unterscheidet (siehe unten).

Die Abklärung der Ursachen dieses Phänomens wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Besonderes Augenmerk sollte auf die Prostaglandinkonzentrationen in der Mukosa gerichtet werden. Weitere Bemühungen sollten darauf verwendet werden, ein chronisches Rattenmodell zu etablieren, um den Einfluß der Operation und der dazu notwendigen Narkose kurz vor Versuchsbeginn ausschalten zu können.

Nach YESAIR et al. (142) und HUCKER et al. (68) hängt die Pharmakokinetik von Indometacin stark von der Futteraufnahme ab.
Die Halbwertszeit beträgt nach oraler Gabe von 10 mg/kg Indometacin etwa 7.6 Stunden bei gefütterten (142) und 4.9 Stunden bei gefasteten Ratten (68). Spitzenplasmakonzentrationen wurden nach 5 bzw. 0.5 Stunden erreicht. Die kumulative Ausscheidung über 24 Stunden betrug bei gefütterten Tieren etwa 30 % der applizierten Dosis gegenüber 57 % bei nüchternen Tieren. Diese Unterschiede im pharmakokinetischen Verhalten sind wahrscheinlich auf Unterschiede in der Resorption bzw. der Reabsorption nach biliärer Elimination zurückzuführen und stützen unsere Hypothese einer geringeren Rezirkulation bei fastenden Tieren.

Neben der Ausscheidung über Niere, Lunge, Haut, Speichel oder Schweiß spielt die biliäre Elimination mancher Pharmaka auch beim Menschen eine wesentliche Rolle (Carbenoxolon, Digitoxin, östradiol, Rifamycin) (12,117).

Der Anteil einer Substanz, der unverändert oder metabolisiert mit der Galle ausgeschieden werden kann, läßt sich aufgrund der Molekülstruktur nicht voraussagen.
Einerseits spielen physikochemische Eigenschaften eine wesentliche Rolle (72, 117). Um eine Elimination mit der Galle zu ermöglichen, muß die Substanz einen deutlich polaren Teilbereich und ein bestimmtes Mindestmolekulargewicht aufweisen. Diese "Galleschwelle" wird bei Ratte und Hund mit 325 ± 50, bei Kaninchen und Mensch mit 474 ± 50 angegeben (12, 72).

Wegen der Molgewichtserhöhung durch Phase-II- Metabolisation werden bevorzugt Konjugate mit Glukuronsäure, Schwefelsäure, Hippursäure, Glatathion etc. biliär ausgeschieden (12).

Der Mechanismus des übertrittes einer Substanz in die Galle ist noch nicht entgültig geklärt.
Voraussetzung ist zunächst die Aufnahme in Leberparenchymzellen. Die biliäre Ausscheidung von Kationen und Anionen erfolgt offensichtlich durch energieabhängige, aktive, sättigbare Transportmechanismen gegen einen Konzentrationsgradienten (116, 117).
Möglicherweise ist der übertritt bestimmter Substanzen in die Galle erst nach Einschluß in mizellähnliche Liposomen aus Gallensäuren, Cholesterin und Phospholipiden möglich (12, 116, 117).

Die mit der Galle in den Dünndarm transportierten Substanzen können in tieferen Darmabschnitten durch Enzymsysteme der natürlichen Darmbakterienflora erneut strukturell

modifiziert werden. Neben hydrolytischer Spaltung von Glukuroniden, Sulfaten, Estern und Glykosiden stehen wegen des Fehlens einer Oxidase und des Sauerstoffes vor allem reduktive Prozesse im Vordergrund (12).

Durch die Hydrolyse der Konjugate werden die Voraussetzungen für eine erneute Resorption in tieferen Darmabschnitten geschaffen, wodurch die Gesamtelimination einer Substanz erheblich verzögert werden kann.

Bei unseren Untersuchungen an den Patienten fällt auf, daß starke Schwankungen bei der Resorption von Arzneistoffen bei bettlägerigen Patienten auftreten können. Die Plasmaeliminationshalbwertszeit (1.3 bzw. 1.6 Stunden) liegt im Bereich gesunder Probanden (41, 57, 61, 81).

Die ermittelte biliäre Eliminationsrate muß wahrscheinlich etwas nach höheren Werten korrigiert werden, da mit den angewandten Techniken keine vollständige Galleableitung garantiert werden kann.
Die physiologische Galleproduktion beim Gesunden wird mit 250-1100 ml Lebergalle/Tag angegeben (83, 116). Sie unterliegt einem Tag - Nacht Rhythmus mit einem Maximum am Nachmittag. Sekretionssteigernde Impulse werden durch den N. vagus vermittelt. Die Lebergalle kann in der Gallenblase auf bis zu einem Zehntel des Ausgangsvolumen eingedickt werden (83).
Das bei Patientin 2 aufgefangene Gallevolumen von 0.5 l kommt diesen Werten sehr nahe. Unter diesen Aspekten dürfte eine hochgerechnete durchschnittliche hepatische Elimination von 1-2 % einer Dosis von 600 mg Ibuprofen realistisch sein.

Die Indometacin Patientin schied innerhalb von 24 Stunden

etwa 7 % einer Dosis von 50 mg in einem Gallevolumen von 230 ml aus. Unter der Annahme, daß mindestens die gleiche Menge physiologisch in den Darm abgelaufen ist, dürften hochgerechnet etwa 15-20 % der Dosis biliär eliminiert werden. Diese Schätzung steht in Einklang mit dem Befund von HUCKER et al. an einer Patientin (68). Aufgrund dieser orientierenden Befunde kann für Indometacin durchaus ein therapeutisch relevanter enterohepatischer Kreislauf beim Menschen vermutet werden. Die von verschiedenen Autoren beschriebene intra- und interindividuell stark schwankende terminale Plasmaeliminationshalbwertszeit von 7.1 - 32.3 Std. (8) bzw. 2.6 - 11.2 Std (6) kann ein Indiz für eine unterschiedlich stark ausgeprägte enterohepatische Zirkulation sein.

Einige kritische Anmerkungen sollen den Wert der am Patienten gewonnenen Erkenntnissen zur biliären Elimination der untersuchten Substanzen objektivieren.

Nach SIEGERS und KLAASSEN (117) liegen bei Patienten häufig hepatobiliäre Erkrankungen oder ein Zustand nach extrahepatischer Cholestase vor. Beeinträchtigungen des hepatischen Arzneistoffmetabolismus und auch der biliären Exkretionsmechanismen können vermutet werden. Außerdem muß noch 2 - 4 Wochen nach operativen im Gallengangssystem mit einer Verminderung des Galleflusses und der Exkretion von Gallensäuren gerechnet werden. Da nach PLAA (103) die Gallensäuren beim Menschen pro Tag 6-8 mal enterohepatisch zirkulieren und nur 20-25 % des Gallensäurepools von 3-5 g faecal ausgeschieden werden, führt die Unterbrechung der physiologischen Rezirkulation außerdem zu einer ausgeprägten Änderung des Galleflusses und der Zusammensetzung der Galle.

Trotz der aufgeführten Probleme ist es notwendig, Daten am Menschen zu erheben, da - wie die oben dargestellten

Ergebnisse zeigen - hinsichtlich des Arzneistoffmetabolismus und der biliären Elimination erhebliche speziesabhängige Unterschiede bestehen und eine Übertragung von Ergebnissen aus Tierversuchen auf die Verhältnisse beim Menschen problematisch ist. Die biliäre Eliminationsrate beim Menschen ist jedoch in der Regel vergleichsweise gering.

Nach DUGGAN et al. (49) läßt sich die unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Spezies für Indometacin-induzierte gastrointestinale Schäden auf den unterschiedlich ausgeprägten enterohepatischen Kreislauf zurückführen. Die enterohepatische rezirkulierende Indometacinmenge bewegte sich zwischen 13 % der verabreichten Dosis beim Kaninchen und 362 % beim Hund. Für den Menschen wurden 9.5 % geschätzt.
Aus dieser Beziehung wurde für den Menschen eine minimale intestinotoxische Tagesdosis von mehr als 10 mg/kg Körpergewicht errechnet.

Stellt man eine ähnliche Betrachtung an mit den oben ermittelten biliären Eliminationsquoten der unveränderten Muttersubstanz (frei + Konjugate) für Indometacin und Ibuprofen bei Ratte und Hund und korreliert diese - wie bereits öfters im Laufe dieser Arbeit beschrieben - unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Wirkpotenz der Substanzen mit den aus der Literatur (1, 49) entnommenen minimalen toxischen Dosen bei den beiden Spezies, ergibt sich im doppeltlogarithmischen Maßstab ein signifikanter Zusammenhang (Tab. 4.9. und Abb. 4.8.).

Eine aus dieser Beziehung hergeleitete rein spekulative minimale intestinotoxische Dosis für den Menschen liegt bei 7.5 mg/kg Indometacin und 34.2 g/kg Ibuprofen.

Tab. 4.9. Biliär eliminierter Anteil als Muttersubstanz (frei + Konjugate) und minimale toxische Dosierungen von Indometacin und Ibuprofen bei Ratte, Hund und Mensch

Spezies	Dosis (mg/kg)	bil.Elim.[a] (% d.Dosis)	Q_I[b] (10^4kg/Mol)	logQ_I	Q_{II}[c] (10^6l/Mol)	logQ_{II}	min.tox.Dosis[d] (mg/kg)	(10^{-6}Mol/kg)	-log
Indometacin:									
Ratte	10.0	14.7	2.014	4.30	11.31	7.05	0.75	2.10	5.68
Hund	10.0	51.7	7.082	4.85	39.77	7.60	0.5	1.40	5.86
Mensch	1.0	5.0	0.685	3.84	3.85	6.59	?	?	?
Ibuprofen:									
Ratte	25.0	15.4	0.177	3.25	0.13	5.11	1600	7767.0	2.11
Hund	10.0	26.0	0.299	3.48	0.22	5.34	125	606.8	3.22
Mensch	9.3	1.0	0.011	2.06	0.01	3.92	?	?	?

Korr.: Log Q_I ↔ -log (min.tox.Dosis): n=4, r=0.958, (-log min.tox.D) = 2.396 + log Q_I - 5.296

Korr.: Log Q_{II} ↔ -log (min.tox.Dosis): n=4, r=0.976, (-log min.tox.D) = 1.460 + log Q_{II} - 4.943

a) eigene Ergebnisse
b) Q_I = bil.Elim. / ED_{50} im Rattenpfotenödem
c) Q_{II} = bil.Elim. / IC_{50} im Prostaglandinassay
d) aus Lit. (1) und (49)

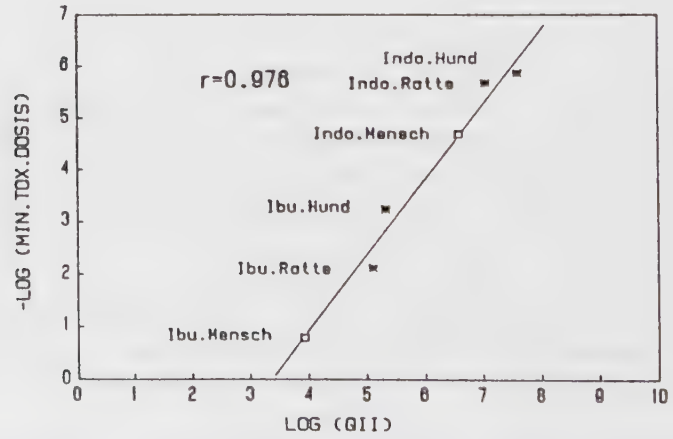


Abb. 4.8. Zusammenhang zwischen biliärer Elimination und minimaler toxischer Dosis von Ibuprofen und Indometacin bei Ratte und Hund. Anhand der Regressionsgerade wurden die minimalen toxischen Dosen für den Menschen errechnet (siehe Text).

Aus den vorgestellten Ergebnissen kann geschlossen werden, daß das Ausmaß der durch einer Substanz aus der Gruppe der NSAIDs hervorgerufenen gastrointestinalen Ulzerationen wesentlich durch die pharmakologische Wirkpotenz der Substanz bestimmt wird. Neben anderen Wirkqualitäten dürfte das Ausmaß der Prostaglandinhemmung ein wichtiger Aspekt bei der Entstehung von Ulzera sein.

Gegenstand weiterer Untersuchungen muß es sein, die gewonnenen Erkenntnisse zur biliären Elimination am Menschen durch weitere Untersuchungen zu bestätigen, da - wie bereits erwähnt - Rückschlüsse aus Tierexperimenten höchst fragwürdig sind.

Nach Bestimmung des Anteils der applizierten Dosis, der vom Menschen biliär eliminiert wird, gilt es zunächst die Fraktion zu bestimmen, die erneut zur Resorption gelangen kann. Anschließend muß versucht werden, Risikogruppen zu definieren, die für einen ausgeprägten enterohepatischen Kreislauf prädestiniert sind.

Dabei muß auch berücksichtigt werden, daß nach CHLUD (37) folgende Patientenkollektive - verglichen mit gesunden, jungen Probanden - besonders empfindlich für gastrointestinale Ulzerationen sind:

- ältere Patienten
- Patienten der Blutgruppe 0
- Patienten mit chronischen Leberkrankheiten
- chronisch Lungenkranke
- Patienten mit chronischer Pankreatitis
- Patienten mit chronischer Polyarthritis

Ziel weiterer Untersuchungen muß es dann sein, Maßnahmen zu finden, den enterohepatischen Kreislauf zu unterbrechen

ohne die erwünschte Wirkung der Substanz zu gefährden.

Wie bereits oben zusammengefaßt gelang es bereits vielen Arbeitsgruppen, durch diätetische Maßnahmen oder Komedikation die intestinotoxische Wirkung von Indometacin bei der Ratte auszuschalten oder zumindest einzuschränken.
Über die Mechanismen, die diesen ermunternden Erkenntnissen zugrunde liegen, wird jedoch meist nur spekuliert. In wie weit diese Erkenntnisse auf den Menschen übertragbar sind, bleibt abzuwarten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden drei typische Vertreter der peripher wirkenden, sauren nichtsteroidalen Analgetika / Antirheumatika (NSAID) hinsichtlich gastrointestinaler unerwünschter Wirkungen und biliärem Eliminationsverhalten untersucht. Hierbei handelte es sich um die Substanzen Indometacin, Ibuprofen und die über eine Säureamidbindung verknüpfte Molekülverbindung aus Ibuprofen und 5-Amino- Salicylsäure.

Ziel der Untersuchungen war festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen den physikochemischen, pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanzen einerseits sowie den gastrointestinalen toxischen Effekten andererseits besteht.

Dazu wurden zunächst physikochemische und pharmakodynamische Parameter der neuen Substanz IBU-5-AS erhoben und Untersuchungen zur Kristallstruktur der Verbindung durchgeführt. Der pK_a - Wert von 4.5 liegt erwartungsgemäß im Bereich anderer NSAIDs. Die Löslichkeit in sauren wässrigen Medien ist relativ gering (0.4 mg/100 ml, pH 2, 25 ^{o}C). Das für die Untersuchungen herangezogene Material hatte rein kristallinen Charakter. In-vitro Untersuchungen zur Beeinflussung des Arachidonsäure Stoffwechsels ergaben eine mit anderen NSAIDs vergleichbare Hemmung der Freisetzung von Prostaglandinen durch IBU-5-AS (IC_{50} = 3.3 * 10^{-5} Mol/l).

Im Carrageenin induzierten Rattenpfotenödem zeigte IBU-5-AS einen signifikanten therapeutischen Effekt (ED_{50} = 2.0 * 10^{-4} Mol/kg Körpergewicht). Die Wirksamkeit von Indometacin und Ibuprofen wurde jedoch zu keinem Zeitpunkt erreicht.

Am häufigsten manifestieren sich unerwünschte Arzneimittelwirkungen der NSAIDs am Gastrointestinaltrakt. Die ulzerogenen Effekte von Indometacin, Ibuprofen und IBU-5-AS wurden sowohl bei nüchternen als auch bei normal gefütterten Ratten quantifiziert.
In beiden Fällen konnte für Indometacin und Ibuprofen ein linearer Zusammenhang zwischen Dosis und dem Ausmaß der gastralen Läsionen nachgewiesen werden. Gefütterte Ratten entwickelten nach beiden Substanzen dosisabhängig Dünndarmschäden.
IBU-5-AS zeigte weder im Magen noch im Dünndarm ulzerogene Effekte.
Ratten, die 24 Stunden vor Versuchsbeginn fasteten, entwickelten unter keiner der drei Substanzen Dünndarmulzera.

Um den Einfluß pharmakokinetischer Parameter auf die unterschiedliche dünndarmschädigende Potenz der untersuchten Substanzen zu eruieren, wurde bei akuten Gallefistelratten das biliäre Eliminationsverhalten nach p.o. und i.v. Applikation untersucht.
Außerdem wurde der Anteil von Muttersubstanz und pharmakologisch aktiven Metaboliten bestimmt, der nach intraduodenaler Infusion arzneistoffhaltiger Galle rezirkuliert, d.h. nach Resorption erneut in der Galle auftritt (Indometacin 30.6 %, DMI 58.7 % , Ibuprofen 21.6 %).

Es konnte gezeigt werden, daß die gastrale Toxizität von NSAIDs bedingt ist durch die Potenz dieser Substanzen als Hemmer der Prostaglandinsynthese einerseits und durch die Löslichkeit (Resorbierbarkeit) im sauren Milieu des Magens andererseits.
Bei nüchternen Tieren ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Quotienten aus der Dosis und der ED_{50} im Rattenpfotenödem (D/ED_{50}) und dem Ausmaß der gastralen Läsionen (Ulkuszahl) ($n=8$, $r=0.904$, $p<0.01$) für die drei Substanzen. Verwendet man den Quotienten aus Dosis und

IC_{50} im PG-Assay und bezieht in diese Überlegungen die Basallöslichkeit der Substanzen ein, d.h. die Löslichkeit in sauren, wässrigen Medien, korrelieren die Wertepaare noch besser (r=0.956). Stellt man diese Überlegungen bei gefütterten Tieren an, findet man eine signifikante Beziehung zwischen dem Quotienten aus Dosis und IC_{50} und der Ulkuszahl (n=8, r=789, $p<0.05$), die jedoch erwartungsgemäß nicht so klar wie bei nüchternen Tieren ausfällt.

Die Dünndarmtoxizität der NSAIDs ist bedingt durch die Potenz dieser Pharmaka als Hemmer der Prostaglandinsynthese und ihrer enterohepatischen Rezirkulation.
Die von normal gefütterten Ratten biliär eliminierten Mengen von Muttersubstanz und wirksamen Metaboliten wurden durch die jeweiligen IC50-Werte im PG-Assay dividiert. Es resultierte ein signifikanter Zusammenhang zwischen diesen Quotienten und dem Prozentsatz intestinaler Ulzerationen (n=5, r=0.879, $p<0.05$).

Betrachtet man unter Berücksichtigung des enterohepatisch zirkulierenden Anteils die Substanzmenge, mit der die Darmmukosa insgesamt konfrontiert wird (nach Division durch die IC50), ergibt sich ebenfalls ein linearer Zusammenhang (n=4, r=0.873) zwischen diesem Quotienten und dem Prozentsatz intestinaler Ulzerationen.

Die Frage, warum nüchterne Ratten keinerlei intestinale Ulzerationen entwickeln, konnte in unseren Versuchen nicht geklärt werden. Nach 5 bzw. 10 mg/kg Indometacin ergab sich zwischen nüchternen und gefütterten "akuten" Tieren kein signifikanter Unterschied hinsichtlich biliärem Eliminationsverhalten von Indometacin und DMI, Gallefluß, Galle pH und der Konzentration an Gesamtgallensäuren. Dieser Befund ist nicht verwunderlich, da durch die Operation bekanntermaßen eine über Stunden anhaltende Darmatonie ausgelöst werden kann.

Flankierende Untersuchungen zur biliären Elimination der gewählten Pharmaka bei anderen Spezies, Hund und Mensch, weisen darauf hin, daß die am Modell der akuten "Gallefistelratte" erhobenen Hypothesen auch für andere Spezies zutreffen.
Der Hund scheidet sowohl Ibuprofen (26.0 + 4.5 % der Dosis in 8 Stunden, n=2) als auch Indometacin (51.7 + 13.8 %, n=4) zu einem wesentlichen Teil als Muttersubstanz (frei + Konjugate) aus.
Korreliert man - unter Berücksichtigung der Wirkpotenz der Substanzen - den als Muttersubstanz biliär eliminierten Anteil der Dosis bei Ratte und Hund mit der minimalen gastrointestinotoxischen Tagesdosis bei beiden Spezies, resultiert in doppelt logarithmischer Darstellung ein linearer Zusammenhang (n=4, r=0,976).

Untersuchungen an Patienten ergaben, daß nach oraler Gabe von 600 mg Ibuprofen höchstens 1.4 % der Dosis mit der Galle eliminiert wurden. Nach einer oralen Dosis von 50 mg Indometacin wurden > 6.8 % der Dosis in 24 Stunden biliär ausgeschieden.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß die Fähigkeit einer Substanz zur Verursachung gastrointestinaler Läsionen eng mit ihrer pharmakodynamischen Wirkpotenz zusammenhängt.
Hinsichtlich der gastralen Nebenwirkungen spielt offensichtlich neben der Hemmung der Prostaglandin Synthese die Löslichkeit der Substanzen im sauren Magenmilieu eine wichtige Rolle. In Hinblick auf die dünndarmschädigenden Eigenschaften ist das Ausmaß der biliären Elimination sowie der enterohepatischen Rezirkulation von Muttersubstanz und pharmakologisch aktiven Metaboliten von wesentlicher Bedeutung.

6. ANHANG

Häufig verwendete Abkürzungen:

MW	= Mittelwert
SD	= Standardabweichung
n	= Anzahl
t	= t-Wert nach dem t-Test nach Student
Signif.	= Signifikanz
KG	= Körpergewicht
mcg	= Mikrogramm
M	= Mol/l

Verwendete Geräte und Analysenbedingungen:

Röntgendiffraktometrie:

Pulverdiffraktometer, Fa. Philips

Analysenbedingungen:

Anodenspannung:	40 kV
Heizstrom:	30 mA
Winkelgeschwindigkeit:	0.05° 2θ / step
Filter:	Nickel, im Primärstrahl
Aperturblende:	1°
Zählrohrblende:	1°, 0.2 mm
Auswertung:	Winc 11, Fa. DEC
	Plotter HP 7225 A

Differentialthermoanalyse

Mettler TA 2000 (b) als Tieftemperaturausführung
(-178 bis 550 °C entspr. 98 bis 823 K)

Analysenbedingungen:

Heizrate:	10 K/min
Probengefäß:	Alu-Tiegel, Deckel perforiert, 40 ul Inhalt, kaltverschweißt
Referenz:	w.o. leer
Spülgas:	N_2 nachgereinigt, 25 ml/min
Einwaage:	2.65 mg
Auswertung:	Datenspeicherung und Ausgabe über Tischrechner HP 9815 A und Plotter HP 7225 A (Fa. Hewlett Packard)

Thermogravimetrie:

Thermoanalysenwaage HE 20, Steuergerät BE 20
(Fa. Mettler)

Analysenbedingungen:

Einwaage:	40 mg
Heizrate:	5 K/min
Meßbereich BE 20:	0.1 g
Spülgas:	Luft, 50 ml/min

Tab. 6.1. Patientendaten IV: Komedikation vor (48 Stunden) und während der Studie:

Pat.1: Urapidil-HCl (Ebrantil^{R}) 2x30 mg/d p.o.
Xipamid 10mg, Triamteren 30mg (Neotri^{R}) 0.5/d p.o.
Amoxicillin 500 mg, Clavulansäure 125 mg (Augmentan^{R}) 3x p.o./d
Pethidin-HCl (Dolantin^{R}) 50 mg i.m.
Diazepam (Diazepam^{R}) 2x5 mg i.m.
N-Butylscopolaminiumbromid (Buscopan^{R}) 2x20mg i.m.

Pat.2: Ranitidin-HCl (Sostril^{R}) 3x168 mg/d p.o.
Norgestrel 0.5 mg/d, Ethinylestradiol 0.05 mg/d p.o. (Eugynon^{R})
Digoxin (Lanicor^{R}) 0.125 mg/d p.o.
Tramadol-HCl (Tramal^{R}) 50 mg s.c.
N-Butylscopolaminiumbromid (Buscopan^{R}) 10mg rec.
Heptbarbital (Medomin^{R}) 200mg p.o.

Pat.3: Oxprenolol-HCl 80 mg, Hydralazin-HCl 25 mg, Chlortalidon 10 mg (Trepress^{R}) 1/d p.o.
Bromazepam (Lexotanil 6^{R}), 1/d p.o.
Sulfacarbamid 0.5g, Phenazopyridin-HCl 0.05 g (Spasmo Euvernil^{R}) 6/d p.o.
Pirenzepin x $2H_2O$ (Gastrozepin^{R}) 2x25 mg/d p.o.
Ranitidin-HCl (Zantic^{R}) 3x168 mg/d p.o.
Bromhexin (Bisolvon^{R}) 3x16 mg/d p.o.

Pat.4: Mezlocillin-Na (Baypen^{R}) 3x2 g/d i.v.
Temazepam (Remestan^{R}) 20mg/d p.o.
Hymecromon (Cholspasmin forte^{R}) 2x400 mg/d p.o.
Isosorbitdinitrat (Isoket 20^{R}) 2x20mg/d p.o.

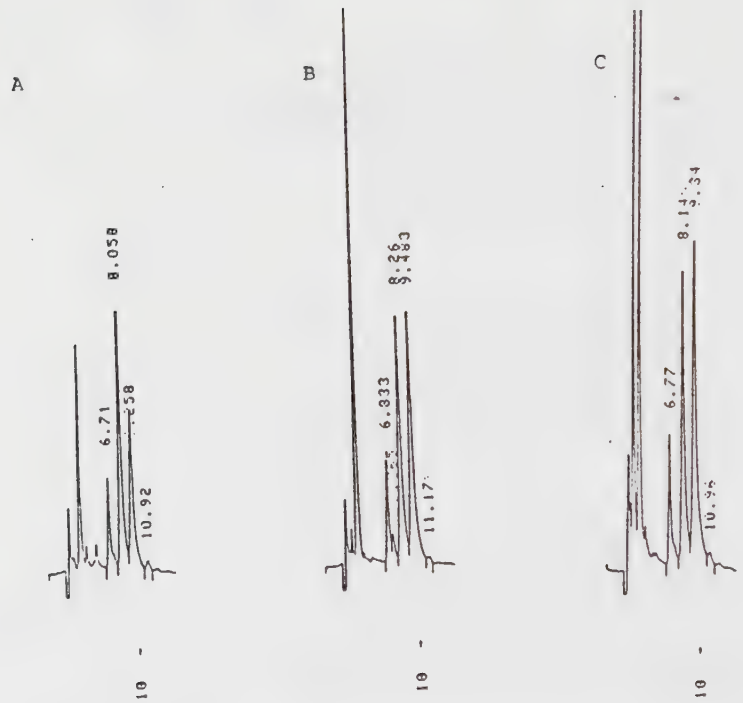


Abb. 6.1a. Typische Chromatogramme von Rattenplasma, -galle, -harn gespikt mit Ibuprofen (t_R: ca. 9.3 min.), Metabolit A., Metabolit B. und Flurbiprofen (int. Standard, t_R: ca. 8.1 min)
A) Plasma, Ibuprofenkonz.: 50 mcg/ml
B) Galle, " : 100 mcg/ml
C) Harn, " : 100 mcg/ml

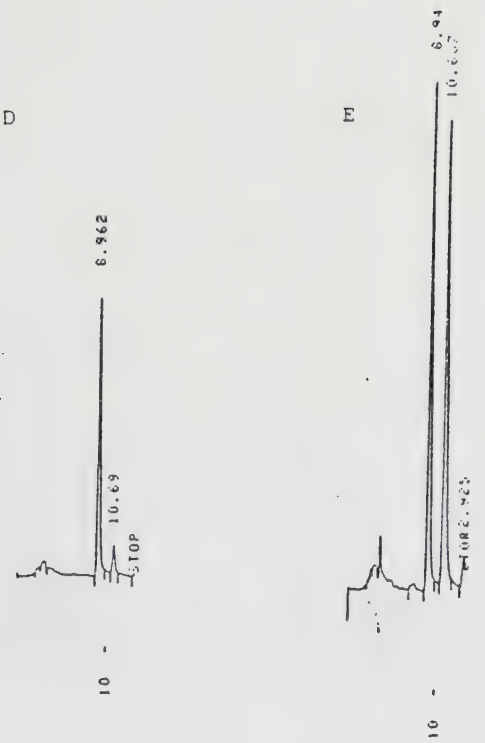


Abb. 6.1b. Typische Chromatogramme von Rattengalle, -harn (Metabolit A t_R: ca. 8.9 min - Metabolit B, t_R: ca. 10.7 min)
D) Galle, 1 Stunde nach i.v. Applikation von 25 mg/kg Ibuprofen Met. A: 86.2 mcg/ml; Met. B: 7.1 mcg/ml)
E) 24 Stunden Sammelharn nach iv. Applik. von 25 mg/kg Ibuprofen Met. A: 180.1 mcg/ml, Met. B: 174.8 mcg/ml)

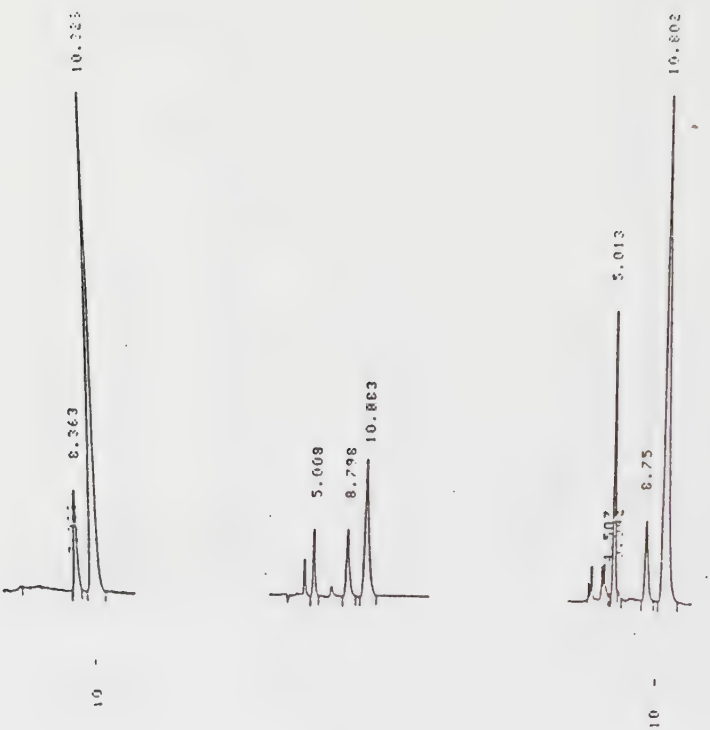


Abb. 6.2a. Typische Chromatogramme von Rattenplasma, -galle, -harn gespikt mit Indometacin (t_R: ca. 10.8 min.), DMI (t_R: ca. 5.0 min.) und Fenoprofen (int. Standard, t_R: ca. 8.7 min)
A) Plasma, (Integrator: atten. 5), Indometacinkonz.: 25 mcg/ml
B) Galle, (" : atten. 8), DMI: 25mcg/ml, Indo: 50mcg/ml
C) Harn, (" : atten. 8), DMI: 100mcg/ml, Indo: 200mcg/ml

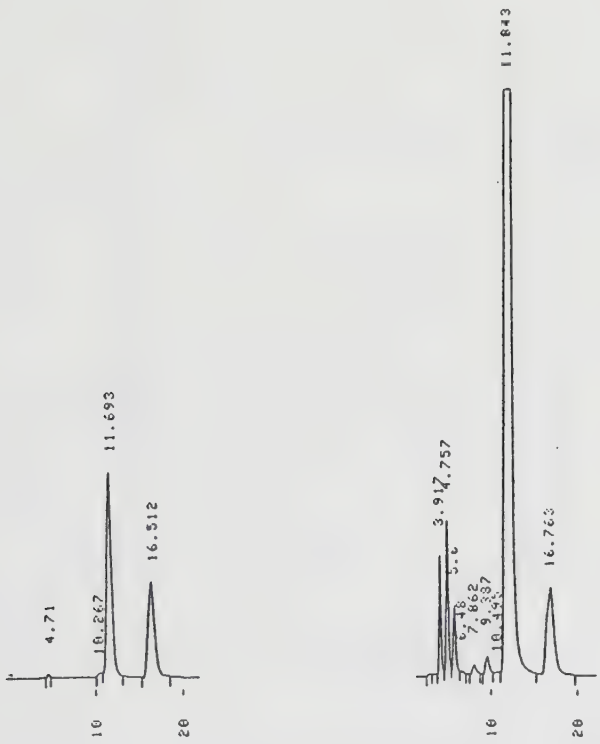


Abb. 6.2b. Typische Chromatogramme von Rattengalle, -harn (DBI: t_R: ca. 11.7 min, DMBI: t_R ca. 4.7 min, 3-Indolessigsäure (int.Standard: t_R ca. 16.6 min)
D) Galle, 3 Stunden nach i.v. Applikation von 10 mg/kg Indometacin DMBI: 0.5 mcg/ml; DBI: 3.2 mcg/ml)
E) 8 Stunden Sammelharn nach iv. Applik. von 10 mg/kg Indometacin DMBI: 4.7 mcg/ml, DBI: 11.8 mcg/ml)

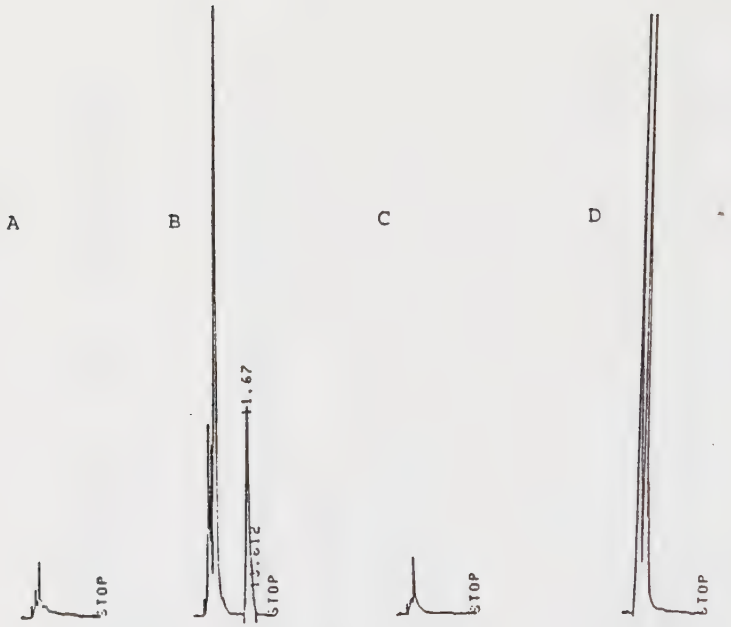


Abb. 6.3. Typische Chromatogramme von Rattengalle, -harn (IBU-5-AS: t_R: ca. 11.7 min)
A) Galle, Leerwert vor Applikation von IBU-5-AS
B) Sammelgalle 4 Stunden nach p.o. Applik. von 44.1 mg/kg IBU-5-AS (Konz. 37.9 mcg/ml)
C) Harn, Leerwert vor Applikation von IBU-5-AS
D) 24 Stunden Sammelharn nach p.o. Applik. von 44.1 mg/kg IBU-5-AS.

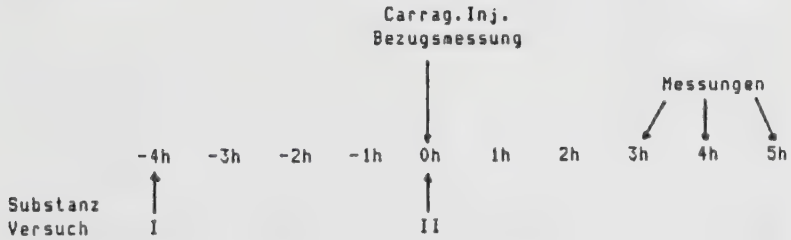
Tab. 6.2. Hemmung des Rattenpfotenödems

Substanz	Dosis (mg/kg KG)	Hemmung (%) Versuch I a)-4h b) 3h	4h	5h	Versuch II a)0h b) 3h	4h	5h
Indometacin	5.0				40.0^{b}	49.2^{a}	56.0^{a}
Ibuprofen	25.0	43.4^{b}	32.9^{b}	25.6^{b}			
	50.0	43.4^{a}	57.0^{a}	44.4^{a}	60.9^{a}	57.5^{a}	57.5^{a}
IBU-5-AS	41.3	-1.9	25.3^{b}	14.4^{b}			
	82.7	37.7^{a}	48.1^{a}	28.9^{a}	31.9^{a}	31.5^{b}	27.4^{a}

a) Zeit der Substanzgabe relativ zur Ödeminduktion
b) Zeitpunkt nach Ödeminduktion

a = $p<0.01$
b = $p<0.05$

Zeitschema:



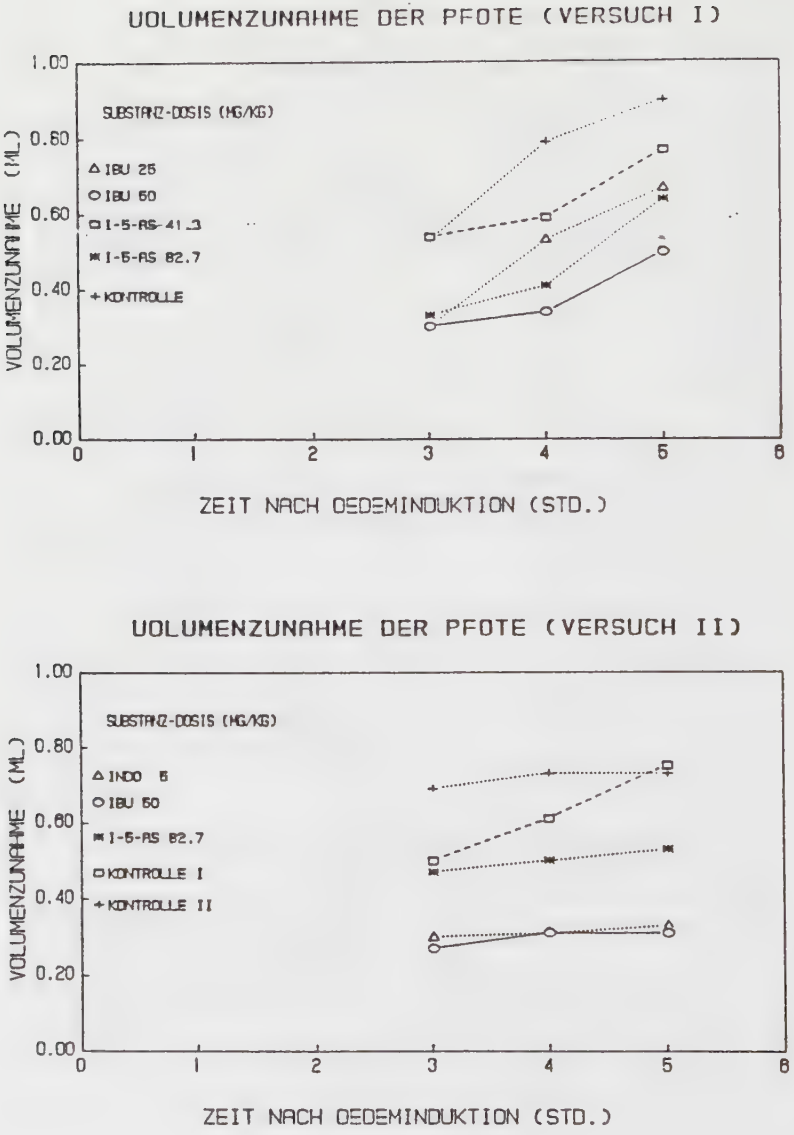


Abb. 6.4. Zeitliche Zunahme des Pfotenvolumens
A) Versuch I: Substanzgabe 4 Stunden vor ödeminduktion
B) Versuch II: Substanzgabe gleichzeitig mit ödeminduktion

Tab. 6.3. Harnausscheidung der Gallefistelratten in 24 Stunden (MW ± SD)

Harnausscheidung (24 Stunden)
alle Angaben in % der Dosis

Ibuprofen:

Dosis, Appl.	Ibuprofen	OH-Ibuprofen	COOH-Ibuprofen	Gesamt
25 mg/kg p.o.	-	21.5 (5.99)	7.3 (2.60)	28.8 (8.46)
i.v.	-	20.5 (7.28)	11.1 (1.79)	31.6 (11.93)
100 mg/kg p.o.	0.1 (0.06)	18.6 (3.88)	9.8 (1.32)	28.5 (4.42)
i.v.	-	9.2 (2.50)	7.2 (1.07)	16.4 (1.88)
Gallerückf.*)	0.6 (0.69)	40.6 (2.00)	5.0 (4.96)	46.2 (2.61)

Indometacin:

	Indo	DMI	DBI	DMBI	Gesamt
5 mg/kg p.o.	< DL	8.2 (3.55)	2.3 (1.45)	7.7 (3.50)	18.2 (7.63)
i.v.	2.0 (1.09)	5.4 (1.32)	5.8 (0.75)	8.2 (1.70)	21.6 (2.79)
10 mg/kg p.o.	0.7 (0.43)	2.5 (1.59)	0.5 (0.26)	2.3 (0.99)	6.0 (1.84)
i.v.	4.0 (1.98)	5.1 (4.99)	1.9 (1.30)	1.0 (1.02)	12.0 (6.20)
Gallerückf.**)	5.5 (0.94)	15.9 (1.46)	8.1 (1.82)	17.2 (4.94)	46.6 (5.87)
nüchtern:					
5 mg/kg p.o.	< DL	2.0 (2.00)	1.8 (1.30)	1.6 (1.00)	5.3 (2.97)
10 p.o.	0.4 (0.69)	3.3 (2.74)	1.0 (0.50)	4.3 (4.23)	9.0 (4.53)

*) Bezogen auf appl. Ibuprofenmenge
**) Bezogen auf appl. Gesamtmenge

Tab.6.4. Renale Elimination der Stoffwechselraten (MW ± SD) in 24 Stunden

Substanz	Dosis, (mg/kg)	Appl.	Ibuprofen	OH-Ibu.	COOH-Ibu.	Gesamt	N
			(% der Dosis)				
Ibuprofen	25	p.o.	0.2 (0.13)	49.9 (6.30)	4.5 (1.30)	54.6 (7.06)	3
		i.v.	--	50.3 (7.58)	8.3 (1.63)	58.6 (8.17)	3

			Indo.	DMI	DBI	DMBI	Gesamt	N
			(% der Dosis)					
Indometacin	10	p.o.	0.1 (0.22)	16.6 (10.03)	2.2 (1.01)	1.6 (0.62)	20.5 (11.77)	3

Tab. 6.5. Korrelation zwischen Dosis und Ulkuszahl unter Berücksichtigung der ED_{50} und der Löslichkeit bei verschiedenen pH-Werten

	D/ED50	(D/ED50)+BL	(D/ED50)+L(pH3)*)	(D/ED50)+L(pH4)*)	(D/ED50)+L(pH5)*)	(D/ED50)+L(pH6)*)
			(10^{-6} Mol/100 ml)			
Indo 5	1.92	1.61	1.65	2.02	5.66	42.12
10	3.84	3.22	3.30	4.04	11.32	84.24
16	6.14	5.16	5.28	6.45	18.11	134.71
Ibu. 25	1.39	14.89	15.32	19.54	61.79	484.28
100	5.56	59.55	61.27	78.17	247.14	1937.10
300	16.69	178.75	183.92	234.66	741.87	5814.79
I-5- 41.4	0.61	0.74	0.76	0.96	3.05	23.92
496.5	7.26	8.78	9.00	11.47	36.30	284.74
Futter:						
r: (N=8)	0.575	0.415	0.415	0.414	0.412	0.411
Indo (N=3)	0.843					
Ibu. (N=3)	1.000					
Nüchtern:						
r: (N=8)	0.904[b]	0.880[b]	0.880[b]	0.879[b]	0.878[b]	0.877[b]
Indo (N=3)	1.000					
Ibu. (N=3)	0.996					

a = $p < 0.05$

b = $p < 0.01$

*) errechnet nach: $c_{ges} = c_{HA} * (1 + 10^{pH-pKa})$ c_{HA} = Basallöslichkeit

Tab. 6.6. Korrelation zwischen Dosis und Ulkuszahl unter Berücksichtigung der IC_{50} und der Löslichkeit bei verschiedenen pH-Werten

		D/IC50	(D/IC50)•BL	(D/IC50)•L(pH3)*)	(D/IC50)•L(pH4)*)	(D/IC50)•L(pH5)*)	(D/IC50)•L(pH6)*)
				(10^{-4} Mol/100 ml)			
Indo	5	1076.9	9.05	9.26	11.31	31.77	236.27
	10	2146.2	18.03	18.46	22.54	63.31	470.88
	16	3438.5	28.88	29.57	36.10	101.44	754.41
Ibu.	25	101.2	10.81	11.15	14.23	44.98	352.58
	100	404.5	43.20	44.58	56.87	179.80	1409.28
	300	1213.6	129.61	133.74	170.63	539.45	4228.18
I-5-	41.4	3.7	0.04	0.05	0.06	0.18	1.45
	496.5	44.1	0.53	0.55	0.70	2.21	17.30
Futter:							
r:	(N=8)	0.789[a]	0.584	0.583	0.575	0.557	0.549
	Indo (N=3)	0.844					
	Ibu. (N=3)	1.000					
Nüchtern:							
r:	(N=8)	0.423	0.956[b]	0.956[b]	0.953[b]	0.946[b]	0.943[b]
	Indo (N=3)	1.000					
	Ibu. (N=3)	0.996					

a = $p < 0.05$

b = $p < 0.01$

*) errechnet nach: $c_{ges} = c_{HA} * (1 + 10^{pH-pK_a})$ C_{HA} = Basallöslichkeit

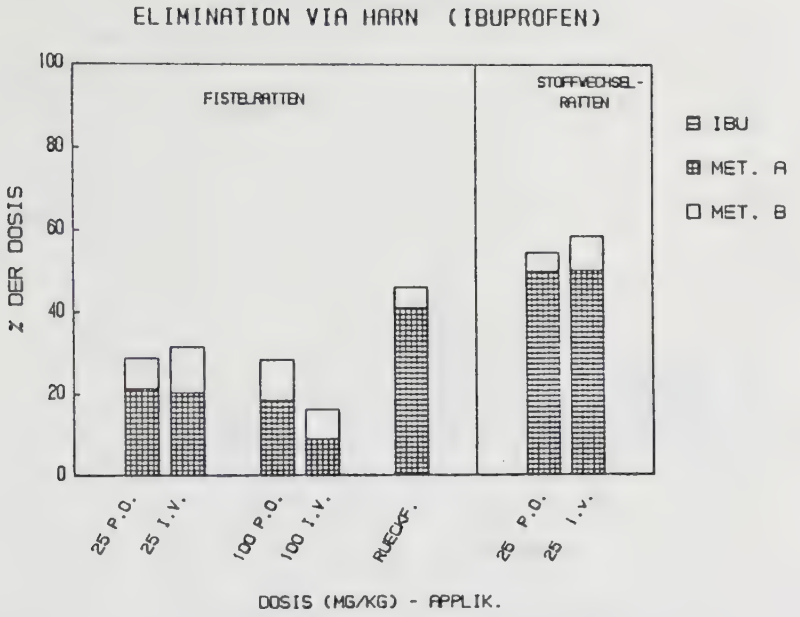


Abb. 6.5. Renale Elimination von Ibuprofen und Metaboliten der Gallefistel- und der Stoffwechselratten in 24 Stunden

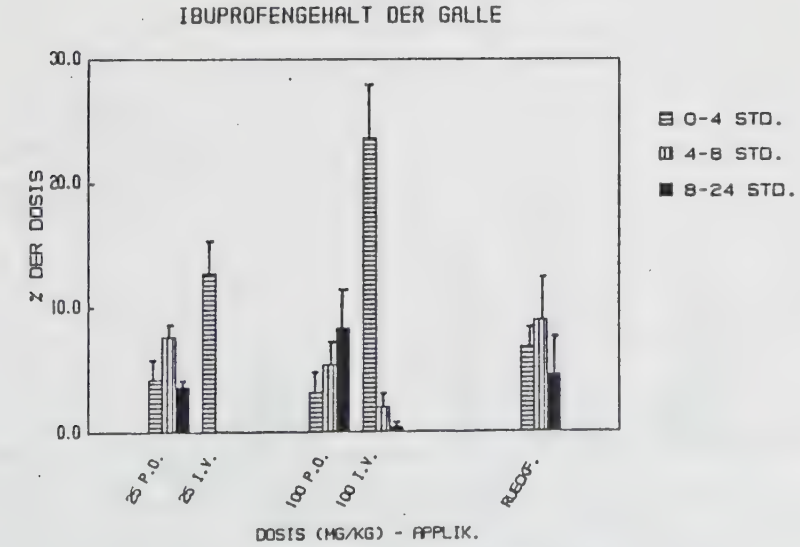


Abb. 6.6. Biliär eliminierte Menge von Ibuprofen (frei + Konjugate) über 24 Stunden (MW ± SD)

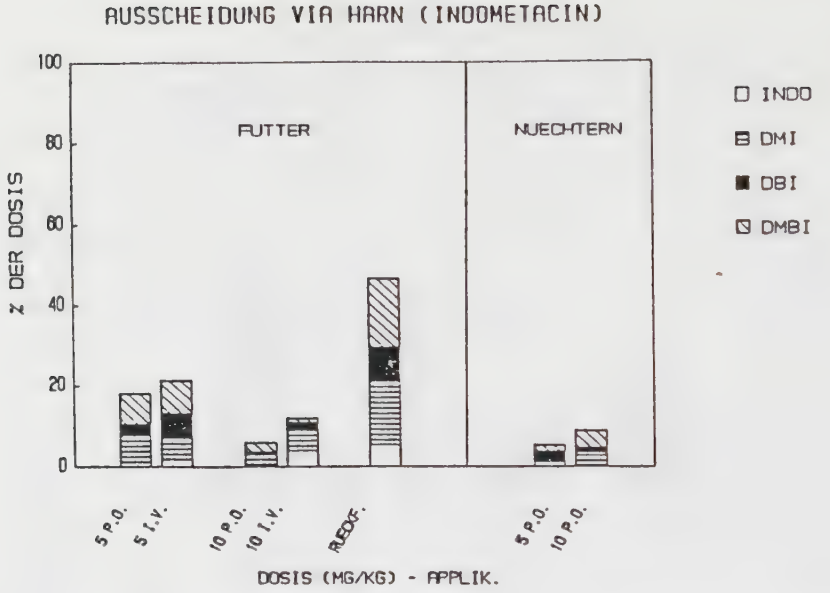


Abb. 6.7. Renale Elimination von Indometacin und Metaboliten der Gallefistelratten in 24 Stunden

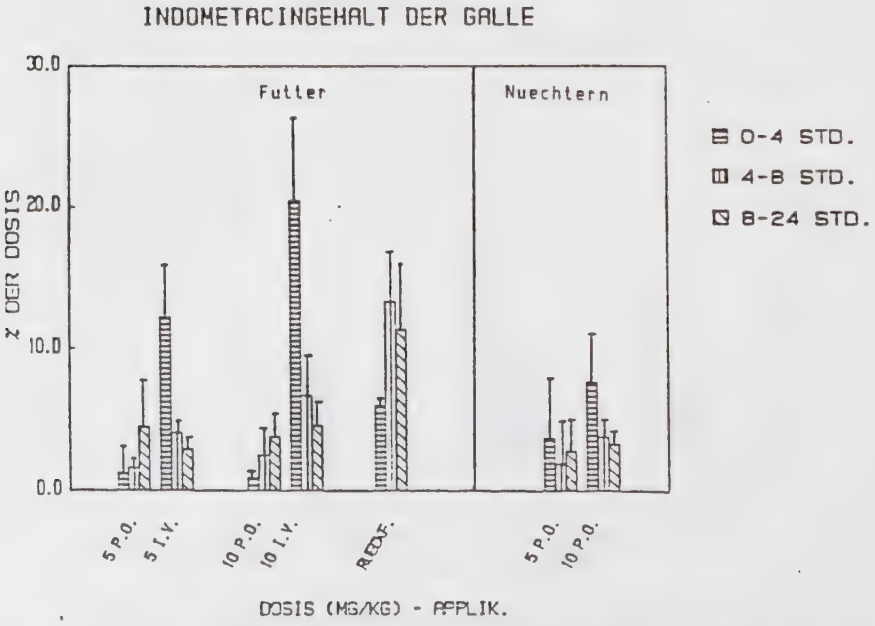


Abb. 6.8. Biliär eliminierte Menge von Indometacin (frei + Konjugate) über 24 Stunden (MW ± SD)

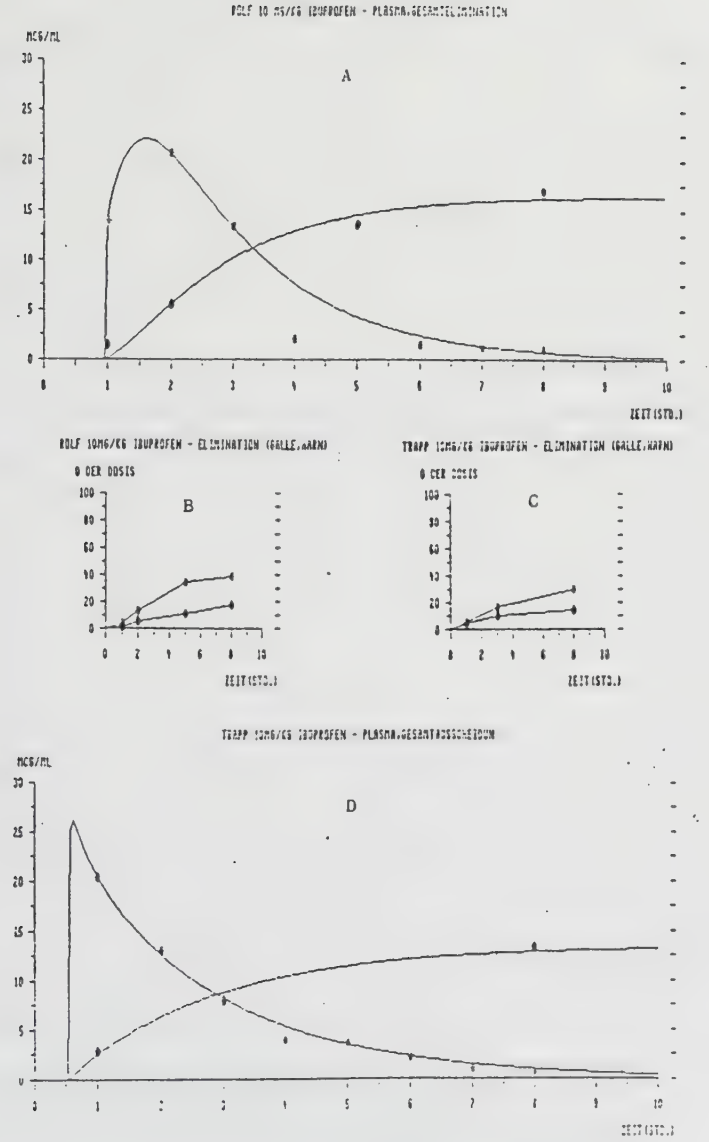


Abb. 6.9. Plasmaspiegel und Elimination beim Hund nach i.d. Gabe von 10 mg/kg KG Ibuprofen
A) Hund R.: Plasmaspiegelkurve (*) und Gesamtelimination (♦)
B) " : Biliär (*) und renal (♦) eliminierter Teil der Dosis
C) Hund Tr: Biliär (*) und renal (♦) eliminierter Teil der Dosis
D) Hund Tr: Plasmaspiegelkurve (*) und Gesamtelimination (♦)

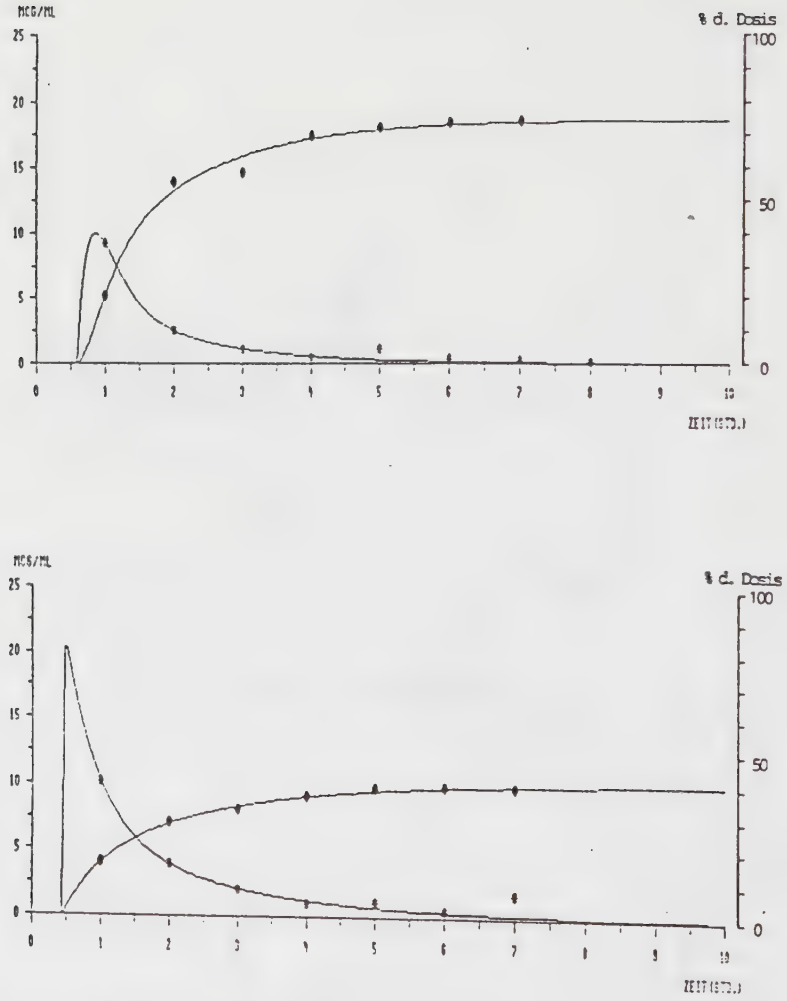


Abb. 6.10a. Plasmaspiegel und Elimination beim Hund nach i.d. Gabe von 10 mg/kg KG Indometacin
A) Hund R.: Plasmaspiegelkurve (▪) und kumulative Galleausscheidung von Indometacin (●)
B) wie A - 2. Versuch

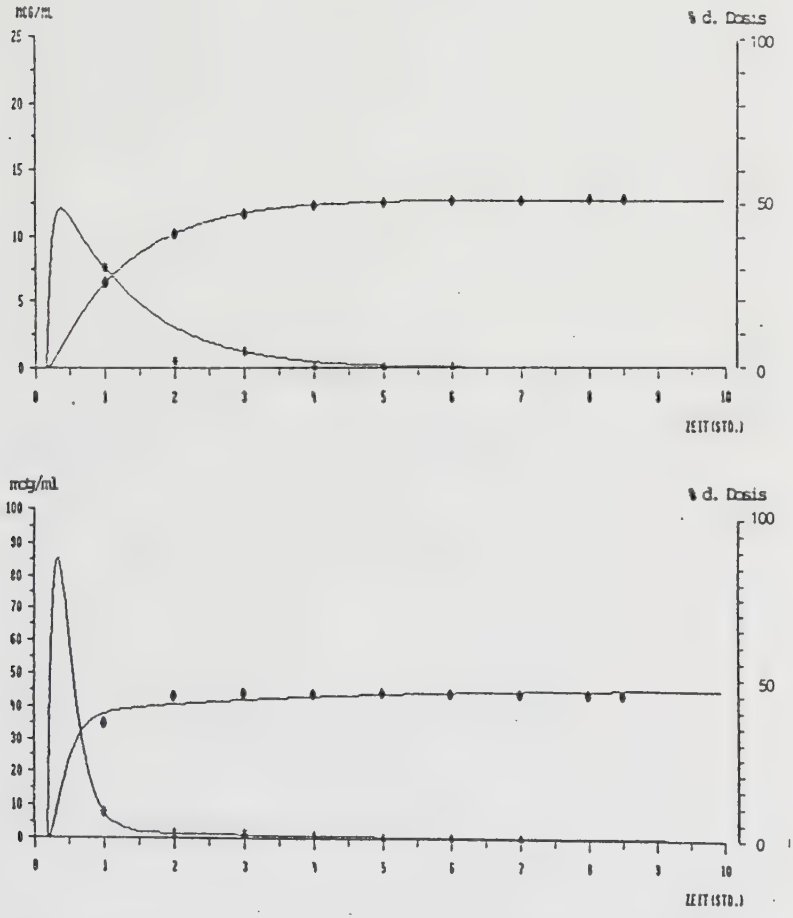
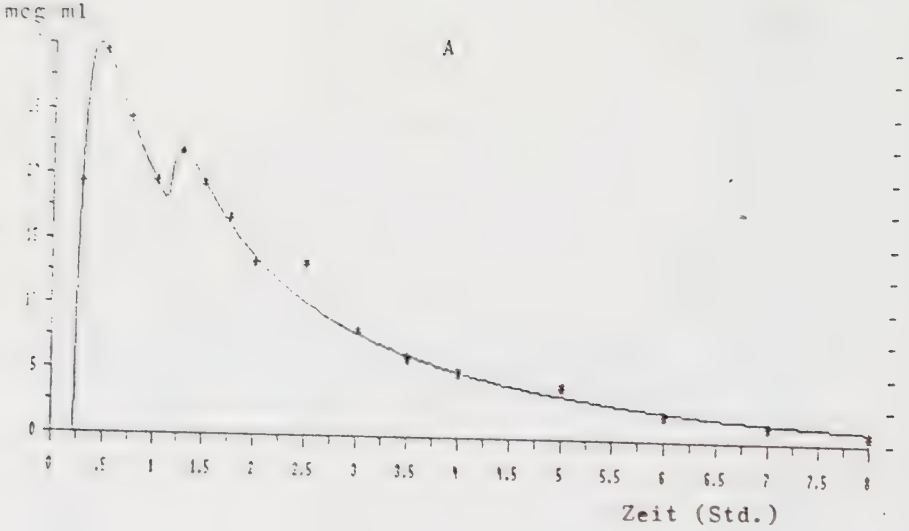


Abb. 6.10b. Plasmaspiegel und Elimination beim Hund nach i.d. Gabe von 10 mg/kg KG Indometacin
A) Hund Tr.: Plasmaspiegelkurve (*) und kumulative Galleausscheidung von Indometacin (♦)
B) wie A - 2. Versuch



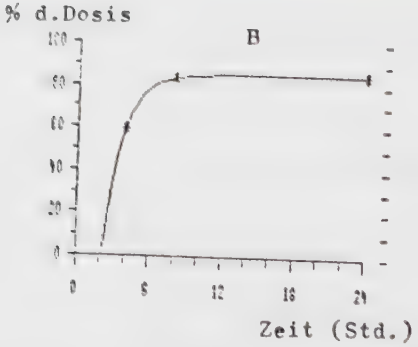


Abb. 6.11a. A) Plasmaspiegelkurve bei Patient 1 nach p.o. Einahme von 600 mg Ibuprofen in Form eines Handelspräparates
B) Kumulative renale Ausscheidung von Ibuprofen und Metaboliten

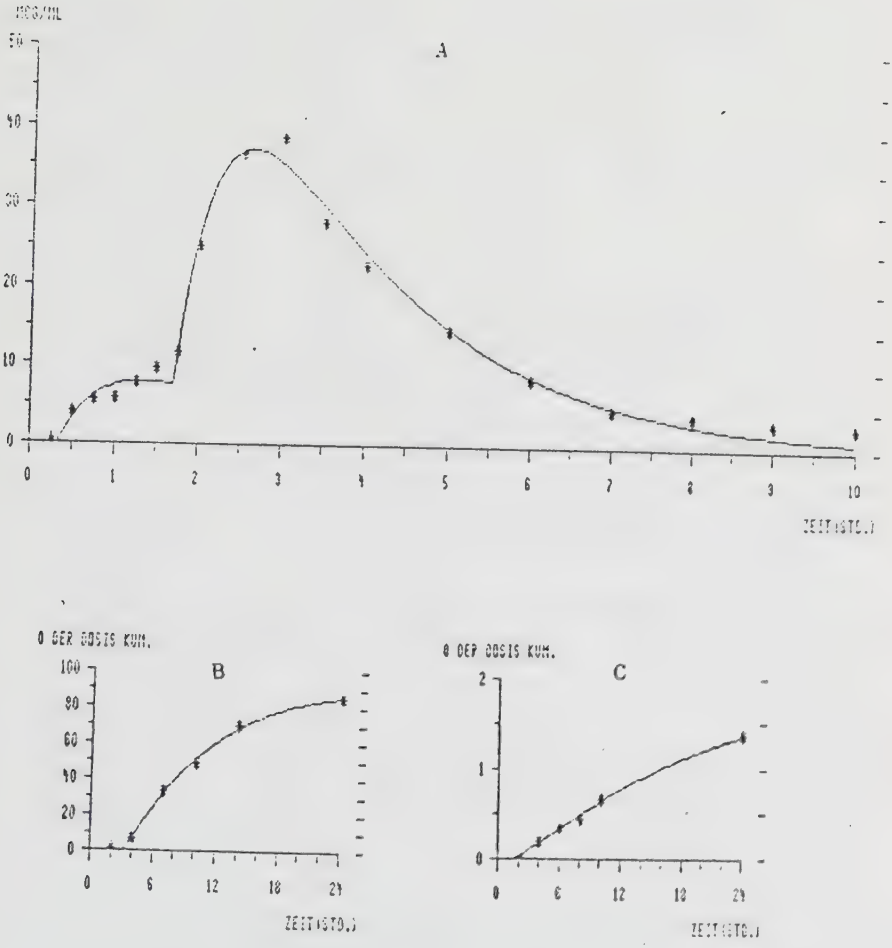
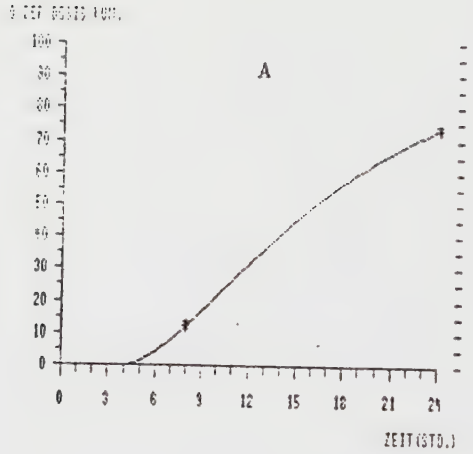


Abb. 6.11b. A) Plasmaspiegelkurve bei Patient 2 nach p.o. Einnahme von 600 mg Ibuprofen in Form eines Handelspräparates
B) Kumulative renale Ausscheidung von Ibuprofen und Metaboliten
C) Kumulative biliäre Ausscheidung von Ibuprofen und Metaboliten



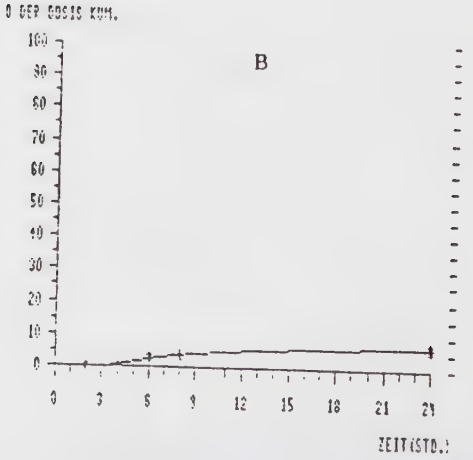


Abb. 6.12. A) Kumulative renale und
B) kumulative biliäre Ausscheidung von Indometacin und Metaboliten bei Patient 4 nach p.o. Einnahme von 50 mg Indometacin in Form eines Handelspräparates

7. LITERATURVERZEICHNIS:

1. Adams S.S., Bough R.G., Cliffe E.E., Dickinson W., Lessel B., McCullough K.F., Mills R.F.N., Nicholson J.S., Williams G.A.H. (1970), Some Aspects of the Pharmacology, Metabolism and Toxicology of Ibuprofen, Rheumatology and Physical Medicine, Suppl.,9-26.

2. Adams S.S., McCullough K.F., Nicholson J.S. (1969), The Pharmacological Properties of Ibuprofen,an Anti-Inflammatory, Analgesic and Antipyretic Agent, Arch.int.Pharmacodyn. 175, 113-129.

3. Albert K.S., Gehnaat Ch.M. (1984), Pharmacokinetics of Ibuprofen, Am.J. Med.,77(1A), 40-45.

4. Albert K.S., Raabe A., Garry M., Antal E.J., Gillespie W.R. (1984), Determination of Ibuprofen in Capillary and Venous Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detektion, J.Pharm.Sci. 73, 1487-1489.

5. Ali A., Kazmi S., Plakogiannis F.M. (1981), High-Pressure Liquid Chromatographic Determination of Ibuprofen in Plasma, J.Pharm.Sci.70, 944-945.

6. Alvan G., Orme M., Bertilsson L., Ekstrand R., Palmer L. (1975),Pharmacokinetics of Indomethacin,Clin.Pharmacol.Ther. 18, 364-373.

7. Aravind M.K., Miceli J.N., Kauffmann R.E. (1984), Determination of Ibuprofen by High-Performance Liquid Chromatography, J.Chrom. 308, 350-353.

8. Astier A., Renat B. (1982), Sensitive High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Indomethacin in Human Plasma, J.Chromat. 233, 279-288.

9. Au S.-L. et al (1984), Disposition of Ibuprofen in Nephrectomized Dogs, J.Pharm. Sci. 73, 705-708.

10. Benzler G. (1982), Thermische Analysen; Grundlagen und Definitionen, CLB Chemie für Labor und Betrieb 33, 1.

11. Billingham M.E.J., Davies G.E.(1979) Experimental Models of Arthritis in Animals as Screening Test for Drugs to Treat Arthritis in Man. In: Vane J R, Ferreira S H (Eds) Antiinflammatory Drugs. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

12. Blume H. (1978), Ausscheidung von Pharmaka mit der Galle und Bedeutung des enterohepatischen Kreislaufs, Pharmazie in unserer Zeit 7, 163-182.

13. Boehringer Mannheim (1986) Produktinformation zu Glukuronidase / Arylsulfatase.

14. Bollman J.L. (1948), A Cage Which Limits the Activity of Rats. J.Labor.Clinic.Med.33: 1348 - 1355.

15. Bozler G., Heinzel G., Koss F.W., Wolf M. (1977), Modellentwicklung in der Pharmakokinetik I. Teil: Allgemeine Strategie. Arzneim.-Forsch./Drug Res.27 (I): 897 - 900.

16. Bray M.A., Gordon D. (1978), Prostaglandin Production in Macrophages and the Effect of Anti-inflammatory Drugs. Brit.Journ.Pharmacol.63: 635.

17. Bresloff P., Oakes R.A. (1974), Ibuprofen: The Inhibition of Prostaglandin Synthesis by Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs including Ibuprofen, Flurbiprofen, 2-(2.2',4'-trifluoro-4-biphenylyl)propionic Acid and 2-4'-cyclohexylphenylpropionic Acid, The Boots Company Limited.

18. Brodie D A, Cook P G, Bauer J Dagl G E (1970), Indomethacin-Induced Intestinal Lessions in the Rat. Toxicol.Appl.Pharmacol.17: 615 - 624.

19. Brooks C.D., Schlagel C.A., Sekhar N.C., Sobota J.T. (1973), Tolerance and Pharmacology of Ibuprofen. Curr.Ther.Res. 15, 180-190.

20. Brune K, Peskar B A, Rainsford K D (1979) Prostaglandin Release from Macrophages: Modulation by Antiinflammatory Drugs. In: Rainsford K D, Ford-Hutchinson A W (Eds) Prostaglandins and Inflammation. Agents and Actions Supplement 6: 159 - 166.

21. Brune K, Rainsford K D, Wagner K, Peskar B A (1981) Inhibition by Antiinflammatory Drugs of Prostaglandin Production in Cultured Macrophages. Naunyn Schmiedebergs Archiv of Pharmacology 315: 269 - 276.

22. Brune K. (1974) How Aspirin Might Work: A Pharmakokinetic Approach. Agents and Actions 4: 230-232 (editorial).

23. Brune K. (1980), Antirheumatika, Prostaglandine und Entzündungen, Schweizerische Rundschau für Medizin: 51/52: 1888 - 1899.

24. Brune K. (1983), Prostaglandins and the Mode of Action of Antipyretic Analgesic Drugs, Am.Journ.Med., 19-23.

25. Brune K., Aehringhaus U., Peskar B.A. (1984), Pharmacological Control of Leukotrien and Prostaglandin Production from Mouse Peritoneal Macrophages. Agents and Actions 14: 5 - 6.

26. Brune K., Dietzel K., Möller N. (1986) Pharmakologie des Schmerzes. In: Wörz R. (Ed.) Pharmakotherapie bei Schmerz. Verlag Chemie, Weinheim: 53

27. Brune K., Dietzel K., Nürnberg B., Schneider H.-Th. (1987), Recent Insight into the Mechanism of Gastrointestinal Tract Ulceration, Europ.Journ.Rheumat., in press.

28. Brune K., Glatt M., Graf P. (1976) Mechanism of Action of Antiinflammatory Drugs. General Pharmacology 7: 27 - 33.

29. Brune K., Glatt M., Kälin H. (1978), Pharmacological Control of Prostaglandin and Thromboxane Release from Macrophages. Nature, New Biol. 274: 261 - 263.

30. Brune K., Lanz R. (1985), Pharmacokinetics of Non-steroidal Antiinflammatory Drugs. In: Bonta I L, Bray M A, Parnham M J (Eds), Handbook of Inflammation. Elsevier Science Publishers B.V.: 413

31. Brune K., Lanz R. (1985), Mode of Action of Peripheral Analgesics, Arzneim.Forsch. (Drug Res.) 34 (II), 1060-1065.

32. Brune K., Lanz R., Schneider E. (1983), Grundzüge der Arzneimitteltherapie rheumatischer Erkrankungen. Aesopus Verlag, Basel, Wiesbaden.

33. Brune K., Schweitzer A., Lanz R. (1983), Importance of Drug Biodistribution and Metabolism in the Development of Side Effects by Antiinflammatory/Analgesic Drugs, in Advances in Inflammation Research Vol. 6, Rainsford K.D., Velo G.P. (Eds.) Raven Press, New York.

34. Burger A., Ramberger R., Schmidt W. (1981), Einfluß der Polymorphie des Wirkstoffes auf die Eigenschaften von Tabletten, Pharmazie 36, 41.

35. Caradoc-Davies T.H. (1984), Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, Arthritis and Gastrointestinal Bleeding in Elderly In-Patients, Age and Aging 13, 295-298.

36. Caruso I., Bianchi Parro G. (1980), Gastroscopic Evaluation of Anti-inflammatory Agents, Brit. Med. Journ. 75-77.

37. Chlud K. (1982), Gastrointestinale Unverträglichkeit - Mechanismen ihrer Entstehung, Akt.Rheumatol 7, 176-178.

38. Clench J., Reinberg A., Dziewanowska J., Ghata J., Smolensky M. (1981), Circadian Changes in the Bioavailability and Effects of Indomethacin in Healthy Subjects, Eur.J.Clin. Pharmacol. 20, 359-369.

39. Colburn W.A. (1984), Pharmacokinetic Analysis of Concentration Time Data Obtained Following Administration of Drugs that are recycled in the Bile, J.Pharm.Sci. 73, 313-317.

40. Coles L.S., Fries J.F., Kraines R.G. (1983), From Experiment to Experience: Side Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, Am.J.Med. 74, 820-828.

41. Collier P.S, D'Arcy P.F., Harron D.W.G., Morrow N. (1978), Pharmacokinetic Modelling of Ibuprofen, Br.J.Clin.Pharmacol. 5, 528-529.

42. DelSoldato P., Meli A. (1978), Further Investigations on Indomethacin and Intestinal Ulcers in the Rat, Toxicology 9, 69-74.

43. DelSoldato P, Foschi D, Varin L, Daniotti S (1985) Indomethacin-induced Intestinal Ulcers in Rats: Effects of Salicylazosulfapyridine and Dexamethasone. Agents and Actions 16: 393-395.

44. Dietzel K, Möller N, Brune K (1984) Nichtsteroidale Antirheumatika: Nebenwirkungen und Interaktionen. Der informierte Arzt - Gazette Medicale 19: 50 - 59

45. Dodge P.W., Brodie D.A., Mitchell B.D. (197)), Evaluation of the Toxicity of Anti-Inflammatory Drugs, in Vane J.R., Ferreira S.H. (Eds.), Anti-Inflammatory Drugs, Handbook of Experimental Pharmacology Vol 50/II, 280-283.

46. Dollery C T, Davies D S (1975) Routes of Administration and Drug Response. In: Eichler O, Farah A, Herken H, Welch A D, (Eds.) Handbook of Experimental Pharmacology 18 (3): 150 - 168.

47. Dost F H (1968) Grundlagen der Pharmakokinetik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

48. Drees D.T., Robbins Th.L., Crago F.L. (1974), Effect of Low-Residue Foods on Indomethacin-Induced Intestinal Lesions in Rats, Toxicol. Appl. Pharmacol., 27, 194-199.

49. Duggan D E, Hooke K F, Noll R A, Kwan K C (1975) Enterohepatic Circulation of Indomethacin and its Role in Intestinal Irritation. Biochem.Pharmacol. 25, 1749-1754.

50. Duggan D.E., Hogans A.F., Kwan K.C., McMahon F.G. (1972), The Metabolism of Indomethacin in Man, Journ.Pharmacol.Exp.Ther. 181, 563-575.

51. Dujorne C A, Pittermann A, Vincek W C, Dobrinska M R, Davies R O, Duggan D E (1983) Enterohepatic Circulation of Sulindac and Metabolites. Clinical Pharmacology and Therapeutics 33 (2): 172 - 177.

52. Dusci L.J., Hackett L.P. (1979), Determination of Some Anti-inflammatory Drugs in Serum by HPLC, J.Chrom. 172, 516-519.

53. Fenner H. (1983), Pharmakokinetik nichtsteroidaler Antirheumatika, Tempo Medical, Sonderausgabe Rheumatologie, 25-38.

54. Ferreira S H, Vane J R (1974) New Aspects of the Mode of Action of Nonsteroid Antiinflammatory Drugs. Annual Reviews of Pharmacology 14: 57 - 73.

55. Ferry D.G., Ferry D.M., Moller P.W., McQueen E.G. (1974), Indomethacin Estimation in Plasma and Serum by Electron Capture Gas Chromatography, J.Chromat. 89, 110-112.

56. Geigy (1980), Wissenschaftliche Tabellen, Teilband Statistik, 8. Auflage, Basel.

57. Geißlinger G., Dissertation in Vorbereitung, Universität Erlangen-Nürnberg.

58. Georgiev (1985), Survey of Drug Research in Immunologic Disease, in Noncondensed Aromatic Derivatives Part V, 12-73, Karger.

59. Glatt M, Kälin H, Wagner K, Brune K (1977) Prostaglandin Release from Macrophages: An Assay System of Antiinflammatory Drugs in vitro. Agents und Actions 7/3: 321 - 326.

60. Greenan D.M., Aarons L., Siddiqui M., Richards M., Thompson R., Higham C. (1983), Dose-Response Study with Ibuprofen in Rheumatoid Arthritis: Clinical and Pharmacokinetic Findings, Br.J.Clin.Pharmac. 15, 311-316.

61. Greenblatt D.J., Arendt R.M., Locniskar A. (1983), Ibuprofen Pharmacokinetics: Use of Liquid Chromatography with Radial Compression Separation, Arzneim.- Forsch./Drug Res. 33(II), 1671-1673.

62. Hammer R, Bozler G, Heinzel G, Koss F W, (1977), Modellentwicklung in der Pharmakokinetik V. Teil: Kumulationsberechnungen und experimentelle Prüfung. Arzneimittel-Forschung / Drug Research 27 (I): 928 - 931.

63. Heinzel G, Hammer R, Wolf M, Koss F W, Bozler G (1977) Modellentwicklung in der Pharmakokinetik III. Teil: Vereinfachte Regeln zur Herleitung von analytischen Lösungen für lineare Kompartiment - Modelle. Arzneimittel-Forschung / Drug Research 27 (I): 904 - 911.

64. Heinzel G, Wolf M, Hammer R, Koss F W, Bozler G (1977) Modellentwicklung in der Pharmakokinetik IV. Teil: Die Ermittlung der Mikrokonstanten in linearen Kompartiment - Modellen. Arzneim.-Forsch. 27 (I): 912 - 928.

65. Herzfeldt C.D., Kümmel R. (1983), Dissociation Constants, Solubilities and Dissolution Rates of Some Selected Nonsteroidal Antiinflammatories, Drug Development and Indus-

trial Pharmacy 9, 767-793.

66. Higgs G A, Vane J R, Hart F D, Wojtulewski J A (1974) Effects of Antiinflammatory Drugs on Prostaglandins in Rheumatoid Arthritis. In: Robinson H J, Vane J R (Eds) Prostaglandin Synthetase Inhibitors. Raven Press, New York: 165 - 173.

67. Hoffmann-La Roche AG (1986), Rheuma, Roche Magazin Nr. 26, 2-12.

68. Hucker H B, Zacchei A G, Cox S V, Brodie D A, Cantwell NHR (1966), Studies on the Absorption, Distribution and Excretion of Indomethacin in Various Species. Journ.Pharmacol. Exp.Therap.153/2: 237 - 249.

69. Jahn U., Wagner-Jauregg Th. (1974), Wirkungsvergleich saurer Antiphlogistika im Bradykinin-, UV-Erythem- und Rattenpfotenödem- Test, Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 24, 494-499.

70. Junginger H. (1978), Physikochemische, spezielle kristallographische Probleme der Wirkstoffoptimierung, APV-Lehrgang: Galenische Wirkstoffoptimierung, Erlangen.

71. Kearns G.L., Wilson J.T. (1981), Determination of Ibuprofen in Serum by High-Performance Liquid Chromatography and Application to Ibuprofen Disposition, J. Chrom. 226, 183-190.

72. Klaasen C D (1977), Biliary Excretion. In: Field J (Ed.) Handbook of Physiology. American Physiology Society, Washington DC: 537 - 553.

73. Kolarz G (1984) Antiinflammatorisch wirksame Substanzen - Antiphlogistika. In: Kuemmerle (Ed.), Klinische Pharmakologie, 4. Auflage.

74. Krupp P., Exer B., Menasse R., Sallmann A., Ziel R. (1976), Zum Wirkungsmechanismus von Voltaren, Therapiewoche 26, 2877

75. Kwan K.C., Breault G.O., Umbenhauer E.R., McMahon F.G., Duggan D.E. (1976), Kinetics of Indomethacin: Absorption, Elimination and Enterohepatic Circulation in Man, Journ.Pharmacokin.Biopharm. 4, 255-280.

76. Kühl G., Wille L., Bolhenius M., Seyberth H.W. (1985), Intestinal Perforation Associated With Indomethacin Treatment in Premature Infants, Eur.J.Pediatr. 143, 213-216.

77. Langman M.J.S., Morgan L., Worrall A. (1985), Use of Anti-inflammatory Drugs by Patients Admitted with Small or Large Bowel Perforations and Haemorrhage, Brit.Med.J., 290, 347-349.

78. Levvy G.A., Conchie J. (1966)., ß-Glucuronidase and the Hydrolysis of Glucuronides, in Dutton G. (Ed.), Glucuronic Acid, Academic Press, New York, London.

79. Levy M et al. (1986) Risks of Agranulocytosis and Aplasic Anemia. Journal of the American Medicinical Association 256 (13): 1749-1757.

80. Lin J H, Yeh K C, Duggan D E (1985) Effect of Enterohepatic Circulation on the Pharmacokinetics of Diflunisal in Rats. Drug Metabolism and Dispositon, 13: 321 - 326.

81. Lockwood G.F., Albert K.S., Gillespie W.R., Bole G.G., Harkcom T.M., Szpunar G.J., Wagner J.G. (1983), Pharmacokinetics of Ibuprofen in Man: I. Free and Total Area/Dose Relationships, Clin.Pharmacol.Ther. 34, 97-103.

82. Lockwood G.F., Wagner J.G. (1982), High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Ibuprofen and its Major Metabolites in Biological Fluids, J.Chrom. 232, 335-343.

83. Loeweneck H. (1977), Morphologie und Physiologie der ableitenden Gallenwege, Medizin in unserer Zeit 1, 130-137.

84. Lombardino J.G. (1985), Medicinal Chemistry of Acidic Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs, in Lombardino J.G. (Ed.), Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs, 254-431, John Wiley and Sons, Inc.

85. Lombardino J.G., Otterness I.G., Wiseman E.H. (1975), Acidic Antiinflammatory Agents - Correlations of Some Physical, Pharmacological and Clinical Data, Arzneim.-Forsch.(Drug Res.) 25, 1629-1635.

86. Lux G., Riemann J.F., Scheubel R., Hochberger J. (1985), Endoskopische Therapie von Gallengangskonkrementen durch Lithotripsie, Fortschr. Med. 103, 888-892.

87. Meier J, Rettig H, Hess H (1981) Biopharmazie, Theorie und Praxis der Pharmakokinetik, Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

88. Mills R.F.N. (1972), The Boots Company Limited, Nottingham England, Ibuprofen: Proportions of Conjugated and Unconjugated Metabolites in Human Urine After Single Oral Doses of the (+) and (-) Isomers of Ibuprofen.

89. Mills R.F.N., Adams S.S., Cliffe E.E., Dickinson W., Nicholson J.S., (1973), The Metabolism of Ibuprofen, Xenobiotica 3, 589-598.

90. Möller N. (1987), Aspekte eines neu entwickelten nichtsteroidalen Antirheumatikums, Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg.

91. Möller N., Dietzel K., Schneider H.-Th., Brune K. (1987), Pharmacological and Toxicological Properties of a new Series of 5-Amino-Salicylic Acid Derivatives (in Vorbereitung).

92. Mörsdorf K., Wolf G. (1972), Vergleichende Untersuchungen zur Wirkungspotenz neuer Antiphlogistika, Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 2105-2110.

93. Müller P., Dammann H.-G., Simon B. (1986), Akute Schädigung der Magenschleimhaut durch Acetylsalicylsäure, Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 36(I),265-268.

94. Münchow O (1953) Der Einfluß von Pharmaka auf Sekretionsleistung und Ulkusentwicklung der Shay-Ratte. Arzneim.-Forsch. 4: 341 - 344.

95. Nielsen-Kudsk (1980), HPLC-Determination of Some Anti-inflamatory Weak Analgetic and Uricosuric Drugs in Human Blood Plasma and its Application to Pharmacokinetics, Acta Pharmacol.Toxicol., 47, 267-273.

96. Nürnberg B (1986) Neue Aspekte der Resorption und Elimination von Diflunisal - einem modernen Salicylat. Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg.

97. Nürnberg B, Kobal, G Szelenyi I, Vergin H, Brune K (1986), Neue Aspekte zur Entstehung intestinaler Ulzera bei der Therapie mit nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSA). Therapiewoche 36: 1224 - 1230.

98. Oechslein W. (1986), Optimierung der Liberation von Diflunisal aus Komprimaten durch Einsatz von teilamorphem Wirkstoff und pH-Wert- beeinflussenden Hilfsstoffen, Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg.

99. Otterness I G, Bliven M L (1985) Laboratory Models for Testing Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. In: Lombardino J G (Ed.) Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. John Wiley and Sons: 112

99. Parnham M J (1986), Eicosanoide und Entzündung: Mechanismus und Perspektiven für die Therapie. Pharmazie heute (Beilage zur DAZ) 3: 211 - 219.

100. Paumgartner G., Horak W., Probst P., Grabner G. (1971), Effect of Phenobarbital on Bile Flow and Bile Salt Excretion in the Rat, Naunyn- Schmiedebergs Arch. Pharmak. 270, 98-101.

101. Peskar B.M., Weiler H., Peskar B.A. (1982), Effect of BW 755 C in Prostaglandin Synthesis in the Rat Stomach, Biochem. Pharmacol. 31,1652-1653.

102. Pitre D., Grandi M. (1979), Rapid Determination of

Ibuprofen in Plasma by High Performance Liquid Chromatography, J. Chrom. 170, 278-281.

103. Plaa G.L. (1975), The Enterohepatic Circulation, in Gilleth, Mitchell (Eds.), Handbuch der exper. Pharmakologie XXVIII / 3, 130-149, Springer.

104. Preisig R, Cooper H L, Wheeler H O (1962), The Relationship between Taurocholat Secretion Rate and Bile Production in the Unaesthetized Dog During Cholinerg Blokkade and During Secretin Administration. Journal of Clinical Investigations 41: 1152-1159.

105. Püschel W, Geiler G (1980) Arthritismodelle. In: David H (Ed.), Ergebnisse der experimentellen Medizin. Tiermodelle menschlicher Krankheitsbilder. 1. Auflage, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin: 249 - 260.

106. Rainsford K D (1984), Side Effects of Anti-inflammatory / Analgesic Drugs: Epidemiology and Gastrointestinal Tract. Trends in Pharmacological Science: 156-159.

107. Rainsford K.D. (1982), An Analysis of the Gastro-intestinal Side-Effects of Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs with Particular Reference to Comparative Studies in Man and Laboratory Species, Rheumatol.Int. 2, 1-10.

108. Ritschel, W.A. (1984), Grundlagen der Pharmakokinetik, in: Kuemmerle (Ed.), Klinische Pharmakologie 1-31.

109. Robert A. (1971), Duodenal Ulcers in the Rat, Production and Prevention, in Pfeiffer C.J. (Ed.), Peptic Ulcer, 21-33, Munksgaard, Copenhagen.

110. Rücker, Schrör (1982), Nichtsteroidale Antiphlogistika- Pharmakokinetik, biologische Wirkungen und Wirkungsmechanismen, Med. Mo.Pharm. 5, 105-119.

111. Samuelsson B (1981) Leukotriens: Mediators of Allergic Reactions and Inflammations. International Archivs of Allergy Applied Immunology 66 (Suppl.1): 98

112. Satoh H, Guth P H, Grossmann M I (1982), Role of Food in Gastrointestinal Ulzeration Produced by Indomethacin in the Rat. Gastroenterology 83: 210 - 215.

113. Schenk D. (1978), Untersuchungen mit Hilfe der Differential- Thermoanalyse. APV-Lehrgang: Galenische Wirkstoffoptimierung, Erlangen.

114. Shah A., Jung D. (1986), Rapid and Simple Determination of the Major Metabolites of Ibuprofen in Biological Fluids by High-Performance Liquid Chromatography, J.Chrom. 378, 232-236.

115. Shen, T.Y., Winter Ch.A. (1977), Chemical and Biological Studies on Indomethacin, Sulindac and their Analogs, Adv. in Drug Res. 12, 89-245.

116. Siegers C.-P. (1984), Biliäre Ausscheidung von Arzneimitteln beim Menschen, Med.Mo.Pharm 7, 329-335.

117. Siegers C.-P., Klaasen C.D.(1983), Die Bedeutung der biliären Ausscheidung von Pharmaka beim Menschen. Deutsche Medizinische Wochenschrift 41: 1564 - 1570.

118. Skellern G.G., Salole E.G. (1975), A High-Speed Liquid Chromatographic Analysis of Indomethacin in Plasma, J. Chromatogr. 114, 483-485.

119. Smith P.C., Benet L.Z. (1984), High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Indomethacin and its two Primary Metabolites in Urine, J. Chromatogr., 306, 315-321.

120. Snider B.G., Beaubien L.J., Sears D.J., Rahn P.D. (1981), Determination of Flurbiprofen and Ibuprofen in Dog Serum with Automated Sample Preparation, J.Pharm.Sci. 70, 1347-1349.

121. Sommerville K., Faulkner G., Langman M. (1986), Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Bleeding Peptic Ulcer, Lancet, 462-464.

122. Szelenyi I (1984), Mukosabarriere - Schutz durch Prostaglandine. Zeitschrift für Allgemeinmedizin 30: 1306 - 1314.

123. Szelenyi I, persönliche Mitteilung

124. Terweij-Groen C.P., Heemstra S., Kraak J.C. (1980), Rapid Determination of Indomethacin and Salicylic Acid in Serum by Means of Reversed-Phase Liquid Chromatography, J.Chrom. 181, 385-397.

125. Thomas J E (1941) An Improved Canula for Gastric and Intestinal Fistulas. Proceedings of the Society of Experimental Biology 46: 260-262.

126. Thoma K., Serno P. (1984), Physikalische Instabilität von AM als Folge von polymorphen Veränderungen der Kristallstruktur, DAZ 124, 2162.

127. Upton R.A. Buskin J.N., Guentert Th.W., Williams R.L., Riegelman S., (1980), Convenient and Sensitive HPLC Assay for Ketoprofen, Naproxen and Other Allied Drugs in Plasma or Urine, J. Chrom., 190, 119-128.

128. Van Arman, Oedema and Increased Vascular Permeability, aus Vane J.R., Ferreira S.H. (Eds.), Antiinflammatory

Drugs, , Handb. Exp. Pharm. 50/II, S. 75-91.

129. Vane J R (1971) Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs. Nature, New Biol. 231: 232 - 235.

130. Vane J R (1978), The mode of Action of Aspirin-like Drugs. Agents and Actions 8: 430 - 431.

131. Vangiessen G.J., Kaiser D.G. (1975), GLC Determination of Ibuprofen (dl-2-(p-Isobutylphenyl)-propionic Acid) Enantiomers in Biological Specimens, J.Pharm.Sci. 64, 798-801.

132. Verbeeck R.K., Blackburn J.L., Loewen G.R., (1983), Clinical Pharmacokinetics of Non-steroidal Antiinflammatory Drugs, Clin. Pharmacokin. 8, 297-331.

133. Walker J R, Boot J R, Cox B, Dawson W (1980), Inhibition of the Release of Slow-reacting Substrate of Anaphylaxis by Inhibitors of Lipoxygenase Activity. Journal of Pharmaceutical Pharmacology 32: 866

134. Wait R., Katschinski B., Logan R., Ashley J., Langman M. (1986), Rising Frequency of Ulcer Perforation in Elderly People in the United Kingdom, Lancet 489-492.

135. Weber J C P (1984) Epidemiology of Adverse Reactions of Non-steroidal Antiinflammatory Drugs. In: Rainsford K D, Velo G (Eds.), Side Effects of Antiinflammatory / Analgesic Drugs (Advances in Inflammation Research, Vol6). Raven Press, New York: 1-7.

136. Weischer C H, Thiemer K (1983), A Method for Induction of Cold Indomethacin and Restraint Ulcers in Rats. Methods and Findings of Experimental Clinical Pharmacology 5 (5): 315 - 319:

137. Wilhelmi G, Menasse-Gdynia (1972) Gastric Mucosal Damage Induced by Non-steroid Anti-inflammatory Agents in Rats of Different Ages. Pharmacology 8: 321 - 328.

138. Windholz M. (1976), The Merck Indes, Rathway, N.J.

139. Winter C A, Risley E A, Nuss G W (1962) Carrageenin-Induced Oedema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. Procedings of the Society of Experimental Biology and Medicine 111: 544

140. Wolf M, Heinzel G, Koss F W, Bozler G (1977), Modellentwicklung in der Pharmakokinetik II. Teil: Verallgemeinerte theoretische Darstellung der vollständigen Integration linearer Kompartiment - Modelle beliebiger Struktur. Arzneimittel-Forschung / Drug Research 27 (I): 900 - 904.

141. Yesair D W,Remington L, Callahan N, Kensler C J (1970), Comparative Effects of Salicylic Acid, Phenylbutazone, Probenecid and Other Anions on the Metabolism, Distribution and Excretion of Indomethacin by Rats. Biochem.Pharmacol. 19: 1591 - 1600.

142. Yesair D.W., Callanan M., Remington L., Kensler C.J. (1970), Role of the Enterohepatic Cycle of Indomethacin on its Metabolism, Distribution in Tissues and its Excretion by Rats, Dogs and Monkeys, Biochem.Pharmacol. 19, 1579-1590.

143. Yesair D.W., Coutinho C.B. (1970), Method for Extraction and Separation of Drugs and Metabolites from Biological Tissue, Biochem. Pharmacol. 19, 1569-1578.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1984 bis Juli 1987 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie - Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie - der Universität Erlangen Nürnberg angefertigt.

Meinem verehrten Lehrer - Herrn Professor Dr. K. B r u n e - danke ich für die Überlassung des Themas, die gewährte Unterstützung und die vielseitige Förderung.

Herrn Prof. Dr. E. N ü r n b e r g - Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie - danke ich für seine Anregungen und Hilfestellungen, sowie die Mühe bei der Durchsicht der Arbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. S. S z e l e n y i, früher Fa. Heumann, Nürnberg, jetzt Leiter der Abteilung Pharmakologie der Fa. Chemiewerke Homburg, Frankfurt/M., gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Durchführung von Tierversuchen.

Für die Durchführung der Untersuchungen zur Aufklärung der Kristallstruktur von IBU-S-AS danke ich Herrn Apotheker G. K u t z - Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie.

Schließlich möchte ich es nicht versäumen, allen Kollegen am Institut für Pharmakologie und Toxikologie für ihre tatkräftige Unterstützung, die fruchtbaren Diskussionen und Anregungen zu danken, vor allem Herrn W.S. B e c k und Herrn Dr. H.-Th. S c h n e i d e r für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung von Tierversuchen.
Wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatte Herr Ing. H. P o g o r z e l s k i, der immer zu Hilfe eilte - auch an arbeitsreichen Wochenenden - wenn ein Gerät seinen Geist aufgab.
Für die wertvolle technische Assistenz danke ich Frau E. Y a s s i n, Frau K. B a c k e r, Frau R. F ä c k e und Herrn M. G i l l i c h.

LEBENSLAUF

Name:	Klaus Erwin Dietzel
geboren am:	16.08.1958
Geburtsort:	Schwarzenbach/Saale, Kreis Hof
Nationalität:	deutsch
Konfession:	evangelisch
Eltern:	Ludwig Dietzel, kaufmännischer Angestellter, Waltraud Dietzel geb. Niebisch
Familienstand:	geschieden

Bisherige Ausbildung:

1964 - 1968	Volksschule, Schwarzenbach/Saale, Kreis Hof
1968 - 1977	Schiller-Gymnasium, Hof
24.6.1977	Allgemeine Hochschulreife
07.1977-09.1978	Wehrdienst in Füssen/Allg. und Bayreuth
11.1978-11.1982	Pharmaziestudium an der Universität Erlangen-Nürnberg
12.1982-11.1983	Praktische Ausbildung in der Beyschlag' schen Apotheke in Herzogenaurach
10.01.1984	Erteilung der Approbation als Apotheker durch das Bayerische Innenministerium
01.1984-07.1984	Vertretungen des Apothekenleiters in öffentl. Apotheken
24.07.1984	Beginn einer naturwissenlichen Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. K. Brune am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Erlangen-Nürnberg
11.1984-12.1984 07.1985-11.1985	Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie

	seit 01.12.1985	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie
Examina:	02.04.1981	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung in Erlangen
	05.11.1982	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung in Erlangen
	15.12.1983	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung in München